

Klaus Heinrich Knopf

INSEKTIZIDE
ERMITTLUNG VON RÜCKSTÄNDEN
AUF FRISCHEM OBST UND GEMÜSE

Frankfurt am Main 1962

1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I n s e k t i z i d e

Ermittlung von Rückständen
auf frischem Obst und Gemüse

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
zu
Frankfurt am Main

vorgelegt
von
Klaus Heinrich K N O P F
Offenbach am Main

November 1962

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



1. Referent: Professor Dr.Dr.W.Diemair
 2. Referent: Professor Dr.G.Pfleiderer
- Tag der mündlichen Prüfung: 20./21.2.1963
Tag der Promotion: 27.2.1963

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für
Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe -
Universität zu Frankfurt am Main auf Anregung von
Herrn Prof. Dr.ing. et Dr.phil. W. D i e m a i r
ausgeführt.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem hochver-
ehrten Lehrer, Herrn Professor Dr.Dr. W. D i e m a i r,
für die Übertragung der Arbeit und für seine wertvollen
Ratschläge verbindlichst zu danken. Ihm danke ich manche
Anregung und die freundliche Erlaubnis zur Erörterung
spezieller Fragen mit Damen und Herren verschiedener
wissenschaftlicher Institute. Den Damen und Herren sage
ich meinen herzlichen Dank.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich auch
an dieser Stelle für die Unterstützung dieser Arbeit.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
<u>Allgemeine Einführung</u>	7
<u>I. Einleitung</u>	11
Synthetische Insektizide	11
Chlorierte Kohlenwasserstoffe	11
Organische Phosphorverbindungen	12
Carbamate	12
Das Zustandekommen und Verhalten von Rückständen	13
Toxizität und Metabolismus	15
Analytische Verfahren	19
Die Bestimmung des Phosphors	21
Die Bestimmung des Chlors	21
Papierchromatographie	22
Dünnschichtchromatographie	22
Gaschromatographie	23
Bestimmung der Cholinesterasehemmung	23
Biologische Methoden	25
<u>II. Experimenteller Teil</u>	33
<u>A. Der Daphnientest</u>	33
Die Zucht der Daphnia magna (Straus)	33
Die Zucht von Ankistrodesmus falcatus	40
Orientierende Untersuchungen über die Empfindlichkeit von Daphnia magna	43
Der Einfluß von Lösungs- und Extraktionsmitteln und Formulierungsgemischen	43
Schwermetallsalze, organische Fungizide und Konservierungsmittel	45
Insektizide	46
Vergiftungsbewegungen	47

	Seite
Kriterien zur Auswertung der Schädigung	50
Der Lichtreiz	51
Der mechanische Reiz	52
Reinigung der Testgefäße	54
Quantitative Untersuchungen	55
Aufstellung von Standardkurven	59
Schwellenwerte	62
Oxydation von Thioverbindungen nach Cook	63
B. <u>Ermittlung von Rückständen</u>	66
Direktverfahren	67
Abwaschverfahren	67
Abwaschversuche mit Pflanzenmaterial	70
Preßsaftverfahren	77
Herstellung der Preßsäfte	77
Modellversuche	82
Feldversuche (qualitativ)	84
Feldversuche (quantitativ)	85
C. <u>Die Dünnschichtchromatographie</u>	93
Beschichtung der Platten	94
Fließmittel und Farbreagentien	94
Rückstandsbestimmungen	98
Modellversuche	98
Ein Feldversuch	99
III. <u>Zusammenfassung</u>	100
<u>Schlußbetrachtung</u>	104
<u>Literaturverzeichnis</u>	107
<u>Anhang</u>	115
Kurvenbilder zu S. 55 - 65	117
Formeln	121

Allgemeine Einführung

Das Gedeihen der Pflanzen und Tiere, die der Mensch zu seiner Ernährung bestimmt hat, ist ständig durch den Anspruch anderer Lebewesen auf Lebensraum bedroht. Für solche Lebewesen wurde im Angelsächsischen der Oberbegriff "pest" geprägt. Er ist umfassender als die deutschen Bezeichnungen Ungeziefer und Unkraut zusammen. Man hat darunter Viren, Bakterien, höhere und niedere Pilze, Unkräuter, Protozoen, Schnecken, Milben, Insekten, Vögel und Nagetiere zu verstehen, die durch ihr Auftreten den Erfolg menschlicher Bemühungen infrage stellen. Nehmen sie überhand, ist der Mensch gezwungen, an die Stelle ihrer natürlichen Feinde zu treten, die durch seine Kultivierungsarbeit verdrängt worden sind. Seine körperlichen Anlagen machen ihn als "Ersatzfeind" denkbar ungeeignet, wenn nicht technische Hilfsmittel benutzt werden, um die Aussichten auf Erfolg zu erhöhen.

Die ursprünglichen Maßnahmen waren in jeder Hinsicht sowohl gegen die Art des Schädlings, gegen die sie gerichtet waren, als auch in ihrer Wirkungsbreite eng umgrenzt. Größere Tiere konnten mit Fallen oder durch Abschuss erlegt werden, mit Leimringen versuchte man der Insekten habhaft zu werden. In vielen Fällen war das Einsammeln von Hand das Mittel der Wahl, was noch vor 20 Jahren beim ersten Auftreten des Kartoffelkäfers in Europa der Fall war. Saßen die Schädlinge an Pflanzenteilen, die von außen nicht zugänglich waren, war es im äußersten Fall notwendig, ganze Kulturen auszurotten, um die Schädlinge an weiterer Verbreitung zu hindern. Die Bekämpfung der Reblaus im vergangenen Jahrhundert ist dafür ein klassisches Beispiel. Unkräuter konnten nur von Hand oder in neuerer Zeit mit entsprechenden Geräten entfernt werden.

Erste Erfolge mit anorganischen Chemikalien wurden mit Hilfe solcher Verbindungen erzielt, deren hohe Toxizität gegen Warmblüter bekannt war. Arsen-, Blei- und Quecksilberverbindungen wurden vorwiegend gegen Insekten im Freiland, Blausäure wurde gegen Vorrats- und Materialschädlinge eingesetzt. In speziellen Anwendungsgebieten wurden elementarer Phosphor und Thalliumverbindungen eingesetzt. Die weniger

toxischen Verbindungen des zweiwertigen Kupfers und der indifferenten Schwefel waren die ersten wirksamen Verbindungen zur Bekämpfung parasitärer Pilzkrankungen.

Bis auf Schwefel und Kupferverbindungen haben anorganische Verbindungen heute an Bedeutung verloren, nicht zuletzt deshalb, weil ihre Anwendung gesetzlich eingeschränkt oder verboten werden mußte. Blei - Arsenverbindungen dürfen beispielsweise im deutschen Weinbau nicht mehr angewandt werden, seit die "Kaiserstuhlkrankheit" als chronische Arsenvergiftung erkannt wurde. Die Situation, in der wir uns heute befinden, ist durch die bevorzugte Anwendung organisch-chemischer Verbindungen gekennzeichnet. Andere Maßnahmen zur Schädlingsbekämpfung haben nur noch untergeordnete Bedeutung.

Für den Gebrauch der Schädlingsbekämpfungsmittel in der Praxis ist eine Einteilung üblich, die nicht nach der Herkunft und dem chemischen Aufbau unterscheidet, sondern nach der Art der Schädlinge, gegen die sie gerichtet sind. Das Pflanzenschutzmittelverzeichnis, das jährlich von der "Biologischen Bundesanstalt für Land- u. Forstwirtschaft" herausgegeben wird und das die amtlich zugelassenen Verbindungen und Verfahren enthält, ist ebenfalls nach solchen Gesichtspunkten eingeteilt, wie folgt:

Insektizide	=	Mittel gegen Insekten,
Acarizide	=	Mittel gegen Milben,
Ovizide	=	Mittel zur Abtötung von Insekteneiern,
Nematodizide	=	Mittel gegen Bodennematoden,
Molluscizide	=	Mittel gegen Schnecken,
Rodentizide	=	Mittel gegen Nagetiere,
Fungizide	=	Mittel gegen parasitäre Pilze,
Herbizide	=	Mittel gegen Unkräuter.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Analytik synthetischer Insektizide. Ihr Ziel sind analytische Verfahren, die der amtlichen Lebensmittelkontrolle schnell Anhaltspunkte über die Art und Menge von Rückständen auf frischem Obst und Gemüse verschaffen.

I. Einleitung

Synthetische Insektizide.

Die Erzeugung natürlich vorkommender Insektizide kommt seit langem dem Bedarf an solchen Wirkstoffen nicht mehr nach. Wenn sie auch weitgehend von synthetischen Verbindungen verdrängt worden sind, haben einige von ihnen heute noch wirtschaftliche und anwendungstechnische Bedeutung. Dazu gehören die Pyrethrine, die in den Blüten von *Chrysanthemum cinerariifolium* vorkommen, die Rotenoide, die in den Wurzeln von *Derris elliptica* enthalten sind, und das Nicotin aus *Nicotiana tabacum*. Die Rotenoide sind starke Fischgifte und wie die Pyrethrine wenig toxisch gegen Warmblüter (81). Sie erfüllen damit eine Forderung, die für synthetische Verbindungen angestrebt wird.

Seitdem die technische Herstellung synthetischer Insektizide möglich ist, hat ihre Anwendung einen stürmischen Verlauf genommen (139). Ihre Konstitution ist der natürlichen Verbindungen nur in einigen Fällen ähnlich. Nahezu alle synthetischen Insektizide sind auf der Grundlage chlorierter Kohlenwasserstoffe, organischer Phosphorverbindungen oder der Carbaminsäure aufgebaut (s. Formelanhang). Vier Gesichtspunkte beeinflussen ihre umfangreiche Weiterentwicklung:

- 1.) Resistenzerscheinungen (50),
- 2.) toxikologische Eigenschaften (145, 146),
- 3.) die Wirkungsdauer und
- 4.) selektive Wirkungen innerhalb der Insektenwelt.

Chlorierte Kohlenwasserstoffe.

Die insektiziden chlorierten Kohlenwasserstoffe können auf eine Anzahl von alicyclischen Verbindungen und von aliphatischen Verbindungen zurückgeführt werden, die mit Arylresten substituiert sind. Im folgenden seien die wichtigsten Gruppen und je ein Vertreter angeführt:

Diphenyläethan	D D T
Cyclohexan	Gamma - HCH
Endomethylenetetrahydroinden	Heptachlor
Hexahydro-bis-methylenaphthalin	Aldrin
Camphen	Toxaphen
Inden	Stroban

Organische Phosphorverbindungen.

Die meisten insektiziden organischen Phosphorverbindungen sind Dialkyl-monoaryl-ester der Orthophosphorsäure bzw. deren Thio- u. dithio-analogen. Dazu kommen Ester und Amide der Phosphonsäure und der Ortho- u. Pyrophosphorsäure.

Phosphonsäureester	Dipterex
Phosphorsäureester	Phosdrin
Thiophosphorsäureester	Parathion
Dithiophosphorsäureester	Malathion
Pyrophosphoramid	Schradan

Carbamate.

Die Ester der Carbaminsäure haben in dem Alkaloid Physostigmin ein natürliches Vorbild, als dessen vereinfachtes Bauprinzip sie aufgefaßt werden können, da ihr Wirkungsmechanismus in vielen Punkten dem des Physostigmins gleicht. Die insektiziden Carbamate sind am Stickstoff mono- oder dialkylsubstituiert. Sevin gehört der ersteren Gruppe, Dimetan und Isolan gehören der letzteren Gruppe an.

Die Nomenklatur der Insektizide, die von amtlichen Stellen in der Bundesrepublik und den USA zugelassen sind und die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ist im Anhang aufgeführt.

Die Insektizide sind in organischen Lösungsmitteln, Fetten und ätherischen Ölen gut, in Aceton und Chloroform sehr gut löslich. Eine Ausnahme davon macht Dipterex, das auch in Wasser sehr gut löslich ist. Ihre Verteilung in Wasser wird durch Lösungsvermittler auf der Grundlage von Tweens und von Phthalaten gefördert.

Das Zustandekommen und Verhalten von Rückständen.

Die Insektizide werden meist in wässriger Suspension mit Spritz-, Sprüh-, Nebel- oder Gießverfahren auf die Pflanzen aufgebracht. Sie bilden dort ein Depot, das auch später hinzukommende Insekten schädigt. Von den spezifischen Eigenschaften eines Insektizides hängt es ab, wie sich das Depot nach dem Abtrocknen des gleichzeitig aufgetragenen Wassers verhält. Nach den Forschungsergebnissen, die bis heute bekannt sind, bestehen unterschiedliche Verhaltensweisen (43, 55, 56, 101, 133, 145, 146), die zur Einteilung von vier Gruppen von Insektiziden Anlaß geben können.

Man kann sie einteilen

- 1.) nach ihrer Verweildauer auf dem pflanzlichen Substrat in langlebige und kurzlebige,
- 2.) nach ihrem Eindringungsvermögen in den pflanzlichen Organismus in nicht-eindringende, eindringende und systemische,
- 3.) nach ihrer Veränderung (Metabolismus) im pflanzlichen Organismus und
- 4.) nach ihrer Veränderung im tierischen Organismus in metabolisierende und nicht-metabolisierende Insektizide.

Die meisten chlorierten Kohlenwasserstoffe und Phosphorverbindungen haben eine lange Lebensdauer. Eine ausgesprochen kurze Lebensdauer haben einige wenige systemische Phosphorverbindungen wie z.B. Phosdrin, Dipterex, DDVP und Dimethoat.

G u n t h e r und B l i n n (67) beschreiben in einer zusammenfassenden Übersicht die Abnahme von Rückständen. Sie geht in drei Phasen vor sich, während derer die prozentuale Abnahme unterschiedlich groß ist. Die erste Phase entspricht den Rückständen, die nur mechanisch auf der Oberfläche haften. Hier ist die prozentuale Abnahme am höchsten (excess). Die zweite Phase (degradation) entspricht den Anteilen, die in die Wachsschicht eingedrungen sind, die dritte Phase (persistence) entspricht den oberen Gewebsschichten von Blättern oder Früchten. Die Abnahme der Rückstände in allen drei Phasen entspricht einer Reaktion erster Ordnung. Wird die prozentuale

Abnahme der Rückstände (logarithmisch) gegen die Zeit (linear) aufgetragen, erhält man für alle drei Phasen eine Gerade mit unterschiedlicher Steigung. Die Geschwindigkeit der Abnahme der Rückstände ist unabhängig von der aufgetragenen Menge im Zeitpunkt der Behandlung, sie ist aber bei ein- und demselben Insektizid je nach der Beschaffenheit des Pflanzenteiles, auf den es aufgebracht wurde, unterschiedlich und hängt von Witterungseinflüssen ab.

Da es sich bei Rückständen von Insektiziden immer um minimale Mengen im Verhältnis zum Substrat handelt, wird ihre Menge nicht in Prozenten, sondern in ppm ausgedrückt. ppm ist die Abkürzung für parts per million und bedeutet das Verhältnis $1 : 1\,000\,000$, d.h. $10^{-3}g$ im Kilogramm oder $10^{-6}g$ im Gramm. Ist die Relation um weitere 3 bis 4 Zehnerpotenzen auseinandergerückt, werden die Werte in ppb = parts per billion = $1 : 10^9$ ausgedrückt.

Das Eindringvermögen in die Gewebe lebender Pflanzen ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Zahlreiche Autoren (45,54, 65,73,81,91,94,96,97,101,140) haben sich mit diesem Phänomen befaßt. Nicht in allen Fällen konnte darüber Übereinstimmung erzielt werden, ob sich die Insektizide lediglich in kutikulären Schichten befinden, oder ob tiefere Gewebsschichten erfasst werden (115,116). Ist das Eindringvermögen stark ausgeprägt, spricht man von seiner Tiefenwirkung. Letztere Erscheinung darf nicht mit systemischer Wirkung verwechselt werden (56,133). Systemische Insektizide dringen in die Transportwege der pflanzlichen Stoffwechselprodukte ein und werden mit ihnen in alle Teile der Pflanze transportiert. Von jungen Organen werden sie besser aufgenommen als von älteren. Die Resorbierbarkeit nimmt in der Reihenfolge Wurzeln, Blätter, Früchte und übrige Sproßelemente ab. Im allgemeinen reicht die Aufnahmefähigkeit der Blätter aus, um in allen Teilen der Pflanze die gewünschte Wirkung zu erreichen. Systemische Insektizide sind Schradan, Systox, Phosdrin, Dipterex und Dimethoat. Iso-lan nimmt eine Zwischenstellung zwischen systemischen Eigenschaften und Tiefenwirkung ein.

Die Umwandlungen der Insektizide in stärker toxische Verbindungen und ihr Abbau werden im Abschnitt "Metabolismus und Toxizität" behandelt.

Die lange Lebensdauer von chlorierten Kohlenwasserstoffen im Boden kann zur Bildung von Rückständen auf indirektem Wege führen. Chlorierte Kohlenwasserstoffe, die in vorherigen Anbauperioden in den Boden gelangt sind, können aufgrund ihres Eindringvermögens in Wurzelgemüsen Rückstände bilden, da sie über mehrere Jahre beständig sind. F a h e y und W e s t l a k e geben für DDT, das sie in 83 verschiedenen Bodenproben untersuchten, eine geschätzte Halbwertszeit (half-life-value) von 7 Jahren an (46,159). B e r g e r (12) gibt einen Zeitwert von 5 Jahren für DDT, Dieldrin, Lindan und Toxaphen an. E d w a r d s (44) konnte nach zwei Jahren nur noch Aldrin als Dieldrin nachweisen; DDT war nach dieser Zeit verschwunden. Über das Eindringvermögen von Aldrin, Lindan, Methoxychlor und DDT in unterirdische Pflanzenteile aus behandelten Böden berichtete L i c h t e n s t e i n (92).

Toxizität und Metabolismus.

Die organischen Phosphorverbindungen und die Carbamate hemmen die hydrolytische Spaltung des Acetylcholins in Cholin und Essigsäure (4,55). Das Acetylcholin wird seit den Entdeckungen L o e w i s (s.a.4) als der Wirkstoff angesehen, der im cholinergischen Nervensystem für die Reizübertragung verantwortlich ist. Der Wirkungsbereich des Acetylcholins sind die motorischen, die parasympathischen und die präganglionären, sympathischen Nervenfasern. In den motorischen Nervenfasern wird bei der Einwirkung eines Reizes zunächst inaktives - wahrscheinlich an ein Fermentsystem gebundenes - Acetylcholin gebildet, zu den motorischen Endplatten transportiert und dort aktiviert. Nach Übertragung des Reizes wird es sofort durch den Enzymkomplex "Cholinesterase" gespalten. Treten an die Stelle des Substrates Acetylcholin Phosphorsäureester, werden sie nicht ohne weiteres gespalten. Sie bilden mit dem Enzym einen lockeren Komplex und verbinden sich mit ihm unter Ab-

spaltung einer Esterkomponente irreversibel. Das Enzym kann dann das Acetylcholin, das auf einen Reiz hin gebildet wird, nicht mehr spalten. Die Anreicherung des Acetylcholins führt zu einer Vergiftung des Organismus. Carbamate verursachen lediglich eine kompetitive Hemmung.

Der Cholinesterasekomplex kann in zwei weitgehend substratspezifische Untergruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe, die echten oder Acetylcholinesterasen, spaltet bevorzugt Acetylcholin und kommt in Nervengeweben und Erythrozyten vor. Die zweite Gruppe, die Aliesterasen, spaltet bevorzugt andere Acylcholine. Aliesterasen werden im Blutserum gefunden.

Signifikante Unterschiede zwischen der Toxizität gegen Warmblüter und insektizider Wirkung, wie sie bei Malathion und Dipterex gegenüber anderen Phosphorverbindungen auftraten, ließen den Schluß zu, daß der Organismus eines Warmblüters die Möglichkeit hat, die Toxizität bestimmter Phosphorsäureester bedeutend herabzusetzen. Dipterex ist bei gleicher insektizider Wirkung wie Parathion im Rattentest bedeutend weniger toxisch als Parathion. Nach neuerer Auffassung ist die entgiftende Wirkung Hydrolasen zuzuschreiben, die Phosphorsäureester zu unwirksamen Dialkylphosphaten spalten (3). Die zwei konkurrierenden Vorgänge, irreversible Komplexbildung und hydrolytische Spaltung, bestimmen die Toxizität eines Phosphorsäureesters. Spaltprodukte, die in Urin und Faeces nachgewiesen werden können, sind Dialkylphosphorsäuren und die dritte Esterkomponente als gepaarte Säure (132,134). So wird Parathion in Diaethylphosphorsäure und p-Aminophenol - aus p-Nitrophenol - gespalten. Auffallenderweise werden auch die Thio- und Dithioverbindungen als Dialkylphosphate und nicht als die ursprünglichen Bausteine ausgeschieden. Die Diskussion über die mögliche Reihenfolge Oxydation-Spaltung oder Spaltung-Oxydation wurde zugunsten der ersten Möglichkeit entschieden (70,142). Im Organismus des Warmblüters erfolgt die Oxydation bevorzugt in der Leber in Gegenwart von Magnesiumionen, Nicotinamid und DPN (26,121). Auch die Spaltung erfolgt in der Leber.

Der Organismus von Insekten vermag Thioverbindungen ebenfalls in die entsprechenden Sauerstoffverbindungen umzusetzen (74). Die Oxydationsprodukte sind nach heutiger Auffassung als die alleinigen Hemmstoffe der Cholinesterasen anzusehen (43). Die von Insekten aufgenommenen Thioverbindungen werden nach demselben Schema aktiviert und gespalten. Die bevorzugte Reaktion ist aber die Bildung des irreversiblen Komplexes Hemmstoff - Esterase. Bei resistenten Insekten wird eine stärkere Aktivität der Hydrolasen beobachtet. Bemerkenswert ist der Abbau von solchen Phosphorverbindungen, die in einer Esterkomponente die Bindungen >C-O-R oder >C-NH-R tragen. Sie werden zuerst an diesen Bindungen gespalten, bevor die Phosphorsäureesterbindung gespalten wird (28,89). Die Spaltprodukte von Malathion, die nachgewiesen werden konnten, sind Dimethylphosphorsäure und Fumarsäure (35). Besonders instabil sind Vinylester und Difterex, von dem man annimmt, daß es vor der Hydrolyse zu DDVP dehydrochloriert wird (27).

Phosphorverbindungen und Carbamate werden nur bei relativ hohen subakuten Gaben, die die Verdauungsorgane nicht passieren, vorübergehend gespeichert und als genuine Verbindungen wieder ausgeschieden. Nach transkutaner Behandlung von Milchkühen mit Malathion konnte innerhalb 24 Stunden nach der Behandlung sein Auftreten in der Milch beobachtet werden (28,29,64). Bei dem Carbatat Sevin wurde dieselbe Beobachtung gemacht (24,68,164). Die Mengen von Phosphorverbindungen und Carbamaten, die als Rückstände im Bereich von 0,1 bis 10 ppm vom Menschen aufgenommen werden, dürfte der Organismus ohne weiteres entgiften. Ein ppm Phosdrin auf 50 g bis 100 g Salat, die ein Mensch während einer Mahlzeit zu sich nimmt, entsprechen etwa $2 \times 10^{-6} \text{ g/kg}$ Körpergewicht. Selbst bei unzulässig hohen Mengen von 10 ppm wäre die akute toxische Dosis von ungefähr 10 bis 50 mg/kg weit unterschritten.

Zeichen akuter Vergiftung beim Menschen sind Verengung der Pupillen (Miosis), Speichelfluß, Verlangsamung der Herztätigkeit, konvulsive Krämpfe und Bewußtlosigkeit. Einige der Symptome können symptomatisch mit Atropin behandelt werden, kausale Wirkung als Antidot hat das Pyridinaldoximmethojodid (PAM),

das in der Lage sein soll, das blockierte Cholinesterasesystem zu reaktivieren.

Während eine Phosphorverbindung allein im Organismus des Säugers abgebaut werden kann, kann bei gleichzeitiger Gabe zweier Phosphorverbindungen der eine der Synergist des anderen sein, wie S e u m e und O' B r i e n für die Kombination Malathion/EPN nachweisen konnten (142). Malathion konnte bei gleichzeitiger Gabe von EPN in allen Geweben der Versuchstiere (Rinder) als Malaoxon, das Sauerstoffanaloge des Malathions, nachgewiesen werden. Mit anderen Kombinationen konnte D u b o i s keinen so stark ausgeprägten Synergismus erzielen (43).

Systemische Insektizide nehmen auch in ihrem Metabolismus eine Sonderstellung ein. Sofern es sich um Thioverbindungen von der Art des Systox und des Dimethoat handelt, werden sie schon in der Pflanze stufenweise oxydiert. Die wirksamen Oxydationsprodukte des Systox und seiner Analogen sind das Thionophosphat-sulfoxyd, das Thiophosphatsulfoxyd und das Thiolphosphatsulfon (104,105,106, 107,108). Dieselben Metabolite werden auch im tierischen Organismus gebildet, wenn die genuinen Substanzen verabreicht werden (98). Schradan wird erst im tierischen Organismus zur wirksamen N-Methylolverbindung oxydiert. Das oxydierte Dimethoat, Phosdrin, Dipterex und DDVP werden in den Pflanzen sehr schnell hydrolytisch gespalten, so daß sie schon innerhalb von 3 bis 4 Tagen nicht mehr nachweisbar sind. Die Gruppe der systemischen Insektizide ist nach R i p p e r (133) in autotoxische (Phosdrin, DDVP), phytometatoxische (Systox, Dimethoat) und zoo-metatoxische Verbindungen (Schradan) einzuteilen.

Das Verhalten der chlorierten Kohlenwasserstoffe ist in wesentlichen Punkten mit dem der Phosphorverbindungen und Carbamate nicht vergleichbar. Metabolite von höherer Wirksamkeit sind außer den Epoxyverbindungen des Aldrin, Isodrin und Heptachlor nicht bekannt (9,38,57). In resistenten Fliegen wurden Abbauprodukte des DDT gefunden, die zwar noch DDT-synergistische Wirkung haben, für sich allein aber unwirksam sind (13,100). Die entgiftende Wirkung wird einem Enzymsystem zugeschrieben, das mit DDTase oder DDT-dehydrochlorinase bezeichnet wurde (128,147).

Die Angriffsstellen der chlorierten Kohlenwasserstoffe sind das zentrale Nervensystem. Auf welche Weise die Vergiftungssymptome ausgelöst werden, ist unklar. Bei Aldrin nimmt man an, daß es den Cholinesterase-Komplex beeinflußt, da vorherige Gaben von Aldrin die Empfindlichkeit gegen Phosphorverbindungen steigern können (8). Die Engstellung der Pupillen, die durch akute Aldringaben verursacht wird, spricht ebenfalls für eine Wirkung in diesem Sinne. Ein direkter Beweis, der in vivo durch die Minderung der Aktivität der Cholinesterasen erbracht werden müßte, fehlt allerdings.

Eine Eigenschaft, die alle chlorierten Kohlenwasserstoffe besitzen, ist die Fähigkeit zur Speicherung im Fett- und Nervengewebe und zur Ausscheidung in der Milch oder in Eiern bis zu einigen Wochen nach ihrer Verabfolgung (58,76,155). Einige chlorierte Kohlenwasserstoffe sind außerordentlich giftig für Fische. Endrin ist die am stärksten toxische Verbindung. Es folgen Isodrin und Toxaphen (0,125), Dieldrin (0,04) und Aldrin 0,02). - Die Zahlenangaben beziehen sich auf Endrin = 1. - Eine annähernd hohe Toxizität für Fische wird bei Phosphorverbindungen und Carbamaten nicht beobachtet. Bei chronischen und akuten Vergiftungen bei Warmblütern werden insbesondere Leberschäden hervorgerufen, die mit einer Senkung des Vitamin-A-Spiegels verbunden sind und bis zur Nekrose führen können. Vergiftungen können nur symptomatisch mit Barbituraten behandelt werden.

Analytische Verfahren.

G u n t h e r und B l i n n haben in dem Werk "Analysis of Insecticides and Acaricides" (66) die wesentlichen analytisch-chemischen Verfahren zur Bestimmung von Rückständen aller gebräuchlichen Insektizide zusammengefaßt und erläutert. Weitere Analysenmethoden neuerer Insektizide finden sich in "Official Methods of the Association of Official Agricultural Chemists".

Im folgenden sei nur auf solche Verfahren hingewiesen, die entweder gruppenspezifisch sind oder in einem Arbeitsgang eine größere Anzahl von Verbindungen erfassen und identifizieren können. Verfahren solcher Art sind:

- 1.) die Bestimmung des Phosphors (Gesamtphosphormethode),
- 2.) die Bestimmung des Chlors (Gesamtchlormethode),
- 3.) die Papierchromatographie,
- 4.) die Dünnschichtchromatographie,
- 5.) die Gaschromatographie,
- 6.) die Bestimmung der Cholinesterasehemmung und
- 7.) biologische Methoden.

Vor jeder Bestimmung müssen die Insektizide von ihrem Substrat isoliert werden und von den mitextrahierten Begleitstoffen getrennt werden. Einen generellen Arbeitsgang, der sämtliche Insektizide erfasst, gibt es nicht. Dies kann auch aufgrund ihres verschiedenen chemischen Aufbaus, ihres unterschiedlichen Verhaltens auf und in den Pflanzen und bei der großen Anzahl von Pflanzenteilen, die als Untersuchungsgüter infrage kommen, nicht erwartet werden. Nach Auswahl geeigneter Lösungsmittel bei der Verteilung zwischen flüssigen Phasen und geeigneter Adsorbentien und Elutionsmittel bei der säulenchromatographischen Reinigung kann die Extraktion und Vorreinigung wie folgt durchgeführt werden:

100 bis höchstens 200 g des Untersuchungsgutes werden im Startmix mit Wasser, einer gesättigten Natriumsulfatlösung oder Methanol fein zerkleinert. Das zerkleinerte Material wird mit einem schwach polaren Lösungsmittel versetzt (Petroläther, Benzol, Methylenchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Trichloräthylen, Äther). Die Extraktion erfolgt, indem das Gerät auf hoher Tourenzahl 3 bis 5 min laufengelassen wird. Wird Wasser beim Zerkleinern verwendet, besteht immer die Gefahr, daß sich schwer zerstörbare Emulsionen bilden. Die Extraktion wird zweimal wiederholt. Die mit Natriumsulfat getrockneten Rohextrakte werden im Vakuum unter Zusatz von Acetonitril eingeengt. Die Acetonitrilphase wird mit Hexan ausgeschüttelt, wobei die Hexanphasen nach Rückextraktion mit Acetonitril verworfen werden. Danach wird das Acetonitril mit der dreifachen Menge Wasser verdünnt und erneut mit Hexan ausgeschüttelt. Nun enthält die Hexanphase die Wirkstoffe. Das Hexan wird getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und auf eine Säule gegeben, wobei in der Wahl der Säulenfüllung und der

Elutionsmittel weitgehende Möglichkeiten bestehen. Das Eluat kann nach Entfernen des Lösungsmittels zur Bestimmung verwendet werden (7,78,84,99,119,123,127).

Die Bestimmung des Phosphors.

Das organische Material wird mit konzentrierter Salpetersäure und Natriumchlorat naß verascht. Der von Salpetersäure befreite Rückstand wird nacheinander mit Schwefelsäure, Ammoniummolybdat, Natriumjodid, Natriumbicarbonat und Natriumsulfit behandelt. Der Farbstoff, der sich dabei gebildet hat, wird photometrisch ausgewertet. Phosphorhaltige Begleitstoffe, die bei der Reinigung nicht entfernt wurden, verfälschen das Ergebnis.

Die Bestimmung des Chlors.

Der Chlorgehalt der meisten chlorierten Kohlenwasserstoffe beträgt zwischen 22 % (Chlorbenzilat) und 73 % (Gamma-HCH), im Mittel 50 %. Die organische Substanz wird nach A g a z z i (2), P e t e r s (129) und W h i t e (160) nach Art der Elementaranalyse zerstört, das gebildete Chlorid wird amperometrisch bestimmt. Da die Methode nach A g a z z i sehr aufwendig ist, hat es an Versuchen nicht gefehlt, Verfahren zu entwickeln, die in jedem Labor durchgeführt werden können.

Nach P h i l l i p s und d e B e n e d i c t i s (131) wird das Chlor mit Natriumisopropylat in Isopropanol, nach L i g - g e t (93) mit Natriumdiphenyl und nach B e c k m a n (10) mit metallischem Natrium abgespalten, das in flüssigem Ammoniak gelöst ist. Die Methode, das Chlor mit Natriumisopropylat abzuspalten, war nach H e l m k a m p (71) und L i s t z (95) einer Verbesserung bedürftig, weil die verhältnismäßig große Menge, die eingesetzt werden muß, nicht in allen Fällen das Chlor quantitativ abspaltet und eine hohe Konzentration an Fremdionen mit sich bringt, die die amperometrische Bestimmung des Chlors stören.

Papierchromatographie.

Die gruppenspezifischen, nicht selektiven Bestimmungsmethoden benötigen qualitative Hilfsverfahren, um die Aussage über einen unbekannten Rückstand abrunden zu können. Dafür kommt in erster Linie die Papierchromatographie in Betracht, die durch C o o k, K l e i n, M i t c h e l l und viele andere eine eingehende Bearbeitung erfahren hat (61,79,83,99,102,110,111,112,113,114,117,138). M i t c h e l l gibt als Universalreagens für die chlorierten Kohlenwasserstoffe und die Phosphorverbindungen 0,05 N-Silbernitrat in einer Mischung von Aceton, Phenoxyäthanol, Wasser und Ammoniak an. Die Vorbereitung der Farbreaktion verläuft über mehrere Stufen. Nach dem Besprühen mit der Silbernitratlösung wird mit UV belichtet. C o o k verwendet N-Bromsuccinimid und Fluorescein als Farbregens. Das Papier wird zuerst mit N-Bromsuccinimid behandelt, das sich mit den Phosphorverbindungen unter Abspaltung von Brom umsetzt. Danach wird das Fluorescein aufgesprüht, das mit nicht verbrauchtem N-Bromsuccinimid Eosin bildet. Anstatt das Papier mit N-Bromsuccinimid zu besprühen, kann es für einige Sekunden in Bromdämpfe gehalten werden (30). Auf die Angaben der genannten Autoren stützt sich ein halbquantitatives Verfahren von S t r a c h e (149) zur Bestimmung chlorierter Kohlenwasserstoffe in Trockenobst. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt nach dem Prinzip der umgekehrten Phasen auf hydrophobiertem Papier. Als Mittel zur Hydrophobierung werden Silikon, flüssiges Paraffin und hochraffinierte Pflanzenöle angegeben. Die Laufzeit beträgt je nach Fließmittel 8 bis 20 Stunden.

Dünnschichtchromatographie.

Die Dünnschichtchromatographie ist ein von S t a h l (143, 144) nach Angaben von K i r c h n e r, H a l l und M i l l e r (82) entwickeltes Verfahren zur Trennung lipophiler Substanzen. Glasplatten werden mit Adsorbentien, die von der Säulenchromatographie her bekannt sind, in dünner Schicht beschichtet. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt nach Verfahren, die aus der Papierchromatographie geläufig sind. Die Laufzeiten

betragen, je nach Wahl des Fließmittels, eine halbe bis zwei Stunden. Zur Bestimmung von Rückständen wurde die Dünnschichtchromatographie bisher kaum verwendet (39,40). S t r a c h e (149) konnte damit keine befriedigenden Ergebnisse erzielen.

Gaschromatographie.

In neuester Zeit gewinnen gaschromatographische Verfahren zur Bestimmung von Rückständen an Bedeutung, da sie geeignet sind, kleinste Mengen zu erfassen. Z w e i g (166) konnte Thiodan bis zu einer Menge von $2,5 \times 10^{-5}$ g erfassen. Mit speziell ausgestatteten Geräten konnten B u r k e, J o h n s o n, C o u l s o n und C a v a n a g h (20,21,22,36) Aldrin, Dieldrin und Gamma-HCH bis zu 2×10^{-10} g erfassen. Es wurde der Versuch unternommen, ungereinigte Extrakte zu analysieren. Er war insoweit erfolgreich, als sich 4×10^{-6} g der Wirkstoffe erfassen ließen, die in einem Extrakt enthalten waren, der 2 bis 5 g Untersuchungsgut entsprach. Bezogen auf das Untersuchungsgut entspricht dies 1 bis 5 ppm. Der Nachteil bei diesem Vorgehen war, daß die Säulen unbrauchbar wurden. Wurden die Extrakte säulenchromatographisch in einem einstufigen Arbeitsgang gereinigt, konnte dieser Mißstand beseitigt und die Empfindlichkeit weiter gesteigert werden. P a u l i g (126) konnte nach den Angaben von B u r k e und J o h n s o n gute Ergebnisse erzielen.

Bestimmung der Cholinesterasehemmung.

Die Bestimmung des Aktivitätsverlustes der Esterasen des Blutserums und der Nervengewebe von Versuchstieren, die mit subakuten Gaben von Phosphorverbindungen und Carbamaten behandelt worden waren, wurde von zahlreichen Autoren durchgeführt (11,16,18,26,70,85,88,89,90,120,122,136,162), um das Bild ihrer toxikologischen Eigenschaften abzurunden. Die quantitative in-vitro-Bestimmung stieß zunächst auf Schwierigkeiten, da es an einem Oxydationsmittel fehlte, durch das die Umsetzung der Thio- und Dithioverbindungen zu ihren Sauerstoffanalogen ermöglicht und die Cholinesterase nicht beeinträchtigt wurde.

C o o k (31,32,33,34) konnte dieses Problem auf einfache Weise lösen, indem er N-Bromsuccinimid und Brom, die ihm bei der Papierchromatographie zur Umsetzung gedient hatten, als Oxydationsmittel benutzte. In gewissen Grenzen störte das überschüssige Brom die Bestimmung nicht. R o s e n t h a l (137) konnte die Annahme, daß die Umsetzung quantitativ verläuft, beweisen, nachdem er mit Paraoxon (E 600) und mit Parathion, das zuvor mit Brom behandelt worden war, nahezu dieselbe Hemmung erzielen konnte. Es zeigte sich auch, daß autotoxische Verbindungen wie Phosdrin nicht weiter aktiviert werden konnten.

Als Enzymquellen kommen menschliches Blutserum (72,103), Erythrozytenesterasen aus Rinderblut und Pferdeblut, Präparate aus Schweinehirn (161) und den Köpfen von Fliegen und Bienen infrage. Die Firma Winthrop liefert ein standardisiertes Präparat. Die Aktivitätsminderung der Esterasen kann einmal anhand der Menge der freigesetzten Essigsäure, zum anderen anhand der Menge des nicht gespaltenen Acetylcholins bestimmt werden. Die titrimetrische Bestimmung nach A u g u s t i n s o n (6) und J a c o b s o n (77), die Messung der Änderung des pH-Wertes nach G i a n g und H a l l (62,63) und die Messung des durch die Essigsäure freigesetzten Kohlendioxyds in der Apparatur nach W a r b u r g beruhen auf der Essigsäurebestimmung, die Umsetzung mit Hydroxylamin und Eisen-III-chlorid zum Eisensalz der Acethydroxamsäure beruht auf der Bestimmung des ungespaltenen Acetylcholins (72).

Wird die prozentuale Hemmung logarithmisch gegen die Konzentration des Hemmstoffes linear aufgetragen, erhält man nach G a g e (56) eine Gerade, die durch den Ursprung des Koordinatensystems geht. Trägt man die prozentuale Hemmung linear und die Konzentration logarithmisch auf, erhält man eine Sigmoidkurve.

F a h e y (47), B o w m a n (14) und C a s i d a (25), G i a n g und H a l l (s.a.56), Z w e i g und A r c h e r (165) führten in jüngster Zeit Rückstandsunter-

suchungen mit dieser Methode durch. Bemerkenswert an diesen Untersuchungen ist die Tatsache, daß B o w m a n und C a s i d a im Preßsaft von Pflanzen ohne jegliche Vorreinigung die Rückstände von Phosdrin bestimmen konnten. Sie stellten gleichzeitig fest, daß Phosdrin in derben Blättern langsamer als in jungen, zarten Blättern abgebaut wird. Nach 4 Tagen längstens war Phosdrin nicht mehr nachweisbar.

Biologische Methoden.

Zur Wertbestimmung physiologisch stark wirksamer Verbindungen werden in der Pharmakologie seit langem biologische Methoden angewandt. Sie werden vor allem dort eingesetzt, wo die Isolierung des betreffenden Stoffes schwierig ist, seine Menge aber ermittelt werden muß. Diese Problemstellung trifft auch für die Bestimmung von Rückständen zu. Es war daher naheliegend, daß für die Bestimmung von Rückständen ebenfalls biologische Methoden entwickelt wurden. Als Testorganismen kamen nur solche infrage, die optimal empfindlich gegen die Wirkstoffe und wenig empfindlich gegen andere Einflüsse sind, die weiterhin gut zu züchten und einfach zu handhaben sind. Diese Bedingungen werden von der Stubenfliege (*Musca domestica*) (139), der Essigfliege (*Drosophila melanogaster*) (152), Moskitolarven (*Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*) (5,23,69,118,154), der Küchenschabe (*Blatella germanica*), dem Wasserfloh (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*), dem Salinenkrebs (*Artemia salina*) und dem Guppy (*Lebistes reticulatus*) (109,124,125,153) weitgehend erfüllt. Bis heute haben nur *Musca* und *Drosophila* allgemeine Verwendung gefunden. Moskitolarven sind zwar die empfindlichsten Testorganismen, sie sind aber auch schwer zu züchten und ausserordentlich empfindlich gegen unspezifische Einflüsse. Beim Salinenkrebs ist es umgekehrt; er ist leicht zu züchten und um eine bis zwei Zehnerpotenzen weniger empfindlich als die übrigen Testorganismen im Durchschnitt.

Das Kriterium, nach dem die Auswertung eines biologischen Testes mit Insektiziden vorgenommen wird, ist der Tod der

Testorganismen oder ein moribunder Zustand, der sich einwandfrei charakterisieren läßt. Eine aussagekraft kann einem biologischen Test nur insoweit beigemessen werden, als er über den Wirkungsgrad eines bekannten Wirkstoffes oder über das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines insektiziden Rückstandes Auskunft gibt. Darin ist er zunächst umfassender, aber auch zugleich unspezifischer als jede chemische oder biochemische Methode (37). Soweit das Untersuchungsgut ohne aufwendige Aufarbeitung zum Test verwendet werden kann, ist er bei Untersuchungsgütern, auf denen Rückstände unbekannter Art und in unbekannter Höhe vermutet werden, als orientierendes Verfahren geeignet. S u n und P a n k a s k i (150,151), F r a w l y (51) und S t e r r a (148) konnten an Bodenproben und einigen Pflanzen zeigen, daß ein Direkttest ohne vorherige Aufarbeitung der Untersuchungsgüter möglich ist. Als Testorganismen verwendeten sie Musca und Drosophila. S u n setzte drei Versuchsreihen mit jeweils 4 x 100 Fliegen an. Der erste Ansatz enthielt das zerkleinerte, rückstandshaltige Material, der zweite unbehandeltes Material mit einem Wirkstoffzusatz von bekannter Höhe, der dritte, als Blindprobe, enthielt nur unbehandeltes Material. Die Versuchsdauer betrug zwischen 24 und 48 Stunden. Zur Auswertung der Versuchsergebnisse hat S u n ein von F i s h e r und Y a t e s (49) und F i n n e y (48) erarbeitetes Verfahren, die Probitanalyse, eingeführt. Sie beruht auf der Annahme, daß die prozentuale Sterblichkeit der Versuchstiere in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration des Wirkstoffes normal verteilt ist. Die prozentuale Sterblichkeit wird in Wahrscheinlichkeitseinheiten = probability units = Probits umgerechnet, bzw. es werden die Probitwerte einer Tabelle entnommen. Die Probitwerte werden gegen den Logarithmus der Zeit oder der Konzentration aufgetragen, je nachdem ob die Zeit ermittelt werden soll, während der bei gegebener Konzentration die Hälfte der Versuchstiere verendet ist (Tempus letale 50 = LT_{50} , engl. lethal time), oder ob die Konzentration ermittelt werden soll, die bei gegebener Zeit die Hälfte der Versuchstiere abtötet (Dosis letalis 50 = DL_{50}). Liegt eine annähernd normalverteilte Empfindlichkeit bei den Testorganismen vor, liegen die

Punkte auf einer Geraden oder weichen wenig davon ab. Nach $S u n$ genügt es, wenn die Gerade nach Augenmaß durch die Punkte gezogen wird; ihre Lage braucht für Rückstandsbestimmungen nicht berechnet zu werden. Mehrere LT_{50} -Werte von verschiedenen Konzentrationen ergeben eine Standardkurve, wenn die Zeit (T_{50}) gegen die Konzentration doppelt-logarithmisch aufgetragen wird. Die Kurve, die daraus resultiert, ist eine Gerade.

Der Fehler, der auftritt, wenn die LT -Werte nach Augenmaß ermittelt werden, ist nach $S u n$ gegenüber anderen Fehlerquellen zu vernachlässigen. Systematische Fehler treten beim biologischen Test dann auf, wenn konstante Versuchsbedingungen nicht eingehalten werden. Das Tiermaterial muß homogen sein, d.h. es muß bei gleichen Bedingungen gezüchtet, gleichartig ernährt, gleich alt und möglichst von demselben Geschlecht sein. Die Lichtverhältnisse und die Temperaturen beim Test sollen ebenfalls konstant sein.

Die Auszählungen bei den Halbwertsverfahren werden nach $M o s e b a c h$ (115,116) zweckmäßig zwischen 20 % und 80 % Mortalität vorgenommen, wobei 4 bis 6 Werte ausreichend sein können.

Drosophila und *Musca* als Landtiere haben sich im Verlauf von unzähligen Versuchen als hochempfindlich und zuverlässig erwiesen, während die im Wasser lebenden *Aedes*larven, Daphnien und Guppies trotz ihrer Empfindlichkeit kaum Verwendung gefunden haben. Die Literatur über die Letztgenannten ist nicht besonders reichhaltig und umfangreich, aber es finden sich Angaben über ihre Zucht, über Versuchsanordnungen und Empfindlichkeiten. $A r d e n$ beschreibt ein Zuchtverfahren für *Aedes* auf einem Blutagar, der zusätzliche essentielle Aminosäuren und Vitamine enthält (5). $H a r t z e l l$ und $S t o r r s$ (69), $B u r c h f i e l d$ (19) und $N o l a n$ und $W i l c o x o n$ (118) beschreiben die verminderte Photophobie von *Aedes*larven unter Einwirkung eines Insektizides.

Sie schufen eine besondere Versuchsanordnung, mit der sie das Ausbleiben von Fluchtbewegungen auf einen starken Lichtreiz hin auswerten konnten. Bemerkenswert ist, daß das Ausbleiben der Reizempfindlichkeit lange vor den wahrnehmbaren Vergiftungsstadien eintrat. Sie konnten damit die Versuchsdauer von ehemals 24 Stunden auf weniger als 5 Stunden verkürzen. Die hohe Empfindlichkeit von Aedes auf andere unspezifische Reize und die schwierige Zucht dürfte ihrer allgemeinen Anwendung Schranken gesetzt haben.

Daphnien, die für physiologische Untersuchungen seit langem verwendet werden, fanden in der Analytik von Insektiziden bislang nur beschränkt Beachtung. B o y d (15) gibt in seiner Dissertation einen umfassenden Überblick über die Verwendung von Daphnia für physiologische Untersuchungen. Der Anlaß, sie näher auf ihre Empfindlichkeit gegen Insektizide und Schwermetallsalze zu untersuchen, ergab sich aus der Feststellung, daß das Fischsterben in Gewässern, in die Insektizide oder Schwermetallsalze gelangt waren, nicht nur auf einer direkten Einwirkung dieser Stoffe auf die Fische beruht, sondern auch auf der letalen Wirkung auf das Zooplankton. Dadurch wird den Fischen wichtige Nahrung entzogen (52,53).

W o l l e r m a n und P u t n a m (163) wiesen die hohe Toxizität von Blei-, Kupfer-, Silber-, Quecksilber-, Cadmium- und Chromverbindungen auf Daphnien nach. Sie verwendeten auch Daphnien für die Bestimmung von Rückständen. Sie verfolgten die systemische Wirkung von Systox an großen Bäumen, die sie im Gießverfahren behandelt hatten, indem sie von beliebigen erreichbaren Stellen der Bäume Blätter ernteten und sie mit der 20-fachen Menge Wasser fein zerkleinerten und auszogen. In das Filtrat brachten sie die Daphnien und beobachteten über 48 Stunden ihre Sterblichkeit. D o w l e y (41), der die systemische Wirkung und den Abbau von Phosdrin, das er auf die Rinde junger Eichen aufgebracht hatte, beobachten wollte, ging ähnlich vor. W a s s e r b u r g e r (157,158), der die Wirkung reiner Verbindungen auf Daphnien studierte, stellte neben ihrer hohen Empfindlichkeit, die er für höher hält als die Empfindlichkeit von Musca und Drosophila, unter-

schiedliche Reaktionen nach Gaben von Parathion, DDT und Lindan fest. Er gibt eine genaue Beschreibung der unterschiedlichen Bewegungen, die die einzelnen Insektizide auslösen, und leitet daraus die Möglichkeit ab, mit dem Daphnientest einen Rückstand qualitativ und quantitativ zugleich ermitteln zu können. K ä m p f e (80), der sich kritisch mit den Angaben von W a s s e r b u r g e r auseinandersetzte, empfiehlt Zurückhaltung in der Bewertung des Vergiftungsbildes eines einzelnen Wasserflohs, bestätigt aber, daß das Gesamtvergiftungsbild eines Testansatzes wohl Aufschluß über die Art eines Insektizides geben könne.

P f a f f (130) konnte noch weitergehende Unterschiede als Wasserburger feststellen. Er untersuchte 16 verschiedene Phosphorverbindungen und gibt an, für die meisten von ihnen charakteristische Vergiftungsbilder erhalten zu haben. Er demonstriert die Zuverlässigkeit seiner Beobachtungen an einem Verdachtsfall, wo ihm die Identifizierung von Parathion gelang, ehe Nachforschungen und andere Untersuchungen seine Angaben bestätigten. In neuerer Zeit befassten sich B r i n g m a n n und K ü h n (17) mit der Empfindlichkeit von Daphnien in Anlehnung an die Angaben von F r e e m a n (52) und W a s s e r b u r g e r. Sie stellten die DL_{50} einer Anzahl von Insektiziden, Schwermetallsalzen und phenolischen Körpern in einem 48 Stunden dauernden Test fest. Innerhalb der Gruppe der Phosphorverbindungen betragen die Unterschiede eine Zehnerpotenz, sieht man von Dipterex ab, sind die Unterschiede aber geringfügig. Viel weniger wirksam sind die chlorierten Kohlenwasserstoffe. Zwischen Dipterex und Lindan besteht ein Unterschied von mehr als 3 Zehnerpotenzen. - Tab. 1 gibt die Ergebnisse von B r i n g m a n n und K ü h n wieder. -

K ä m p f e, W a s s e r b u r g e r und P f a f f führten ihre Untersuchungen mit Daphnien durch, die sie im Freiland gefangen hatten, und beobachteten je nach Jahreszeit Unterschiede in der Empfindlichkeit. K ä m p f e führt dies auf den "Generationswechsel" der Daphnien zurück, der von jahreszeitlichen Einflüssen und dem Futter, das sie in ihrer natürlichen Umgebung antreffen, abhängig ist. Ein sol-

Tab.1: Wirkung von Insektiziden, Schwermetallsalzen und Phenolen auf Daphnia magna nach Bringmann und Kühn.

Wirkstoff	LD ₅₀ nach 48 Std. (g/ml)	Wirkstoff	LD ₅₀ nach 48 Std. (g/ml)
Chlorthion	$4,2 \times 10^{-9}$	Systox	$2,0 \times 10^{-8}$
Dipterex	$0,4 \times 10^{-9}$	Hg ⁺⁺	$2,0 \times 10^{-8}$
Diazinon	$2,5 \times 10^{-9}$	Cu ⁺⁺	10^{-7}
Malathion	$3,0 \times 10^{-9}$	Ag ⁺	$3,0 \times 10^{-8}$
Parathion	$1,8 \times 10^{-9}$	CrO ₄ ⁻⁻	$7,0 \times 10^{-7}$
Aldrin	$2,7 \times 10^{-7}$	Cd ⁺⁺	10^{-7}
Dieldrin	$2,3 \times 10^{-7}$	Anilin	$4,0 \times 10^{-7}$
DDT	$2,0 \times 10^{-8}$	Chinhydron	$4,0 \times 10^{-7}$
Endrin	$3,9 \times 10^{-8}$	Chinon	$4,0 \times 10^{-7}$
Heptachlor	$2,0 \times 10^{-7}$	p-Amino-phenol	$4,0 \times 10^{-7}$
Hostatox	$1,7 \times 10^{-7}$	Hydrochinon	$6,0 \times 10^{-7}$
Lindan	$7,2 \times 10^{-7}$	Phloroglucin	$6,0 \times 10^{-7}$
Thiodan	$2,2 \times 10^{-7}$	Toluidine	$6,0 \times 10^{-7}$
Toxaphen	$1,6 \times 10^{-7}$	Resorcin	$8,0 \times 10^{-7}$
Metasystox	$4,4 \times 10^{-7}$		

ches Tiermaterial erfüllt nicht alle Bedingungen, die gleichbleibende Ergebnisse gewährleisten. K o c h e r (86), B o y d (15) und S e u m e (141) haben daher den Versuch unternommen, Daphnien unter konstanten Bedingungen zu züchten. K o c h e r, der *Daphnia pulex* für seine Untersuchungen verwendete, achtete nur auf reichlich vorhandenes Futter in einem Becken, das im Freien aufgestellt war. S e u m e führte seine Zucht in großen Becken durch, die er in Gewächshäusern aufgestellt hatte. Er gibt ein Zuchtverfahren an, mit dem er durch bestimmte Fütterungsregeln ein von jahreszeitlichen Einflüssen unabhängiges Tiermaterial erhielt. Die Daphnien werden mit der einzelligen Alge *Ankistrodesmus falcatus* im Überschuß gefüttert, bis die Weibchen des Zuchtansatzes ein Intermediärstadium erreicht haben, in welchem sie weder parthenogenetische, vivipare Junge noch gamogenetische Dauereier (Ephippien) ausbilden. Diese von ihm mit "Intermediärweibchen" bezeichneten Daphnien verwendete er zum Test.

B o y d schlug einen anderen Weg ein, um zu einem einheitlichen Tiermaterial zu kommen. Er setzte vermehrungsfähige Weibchen in einem Zuchtbecken aus und trennte die Jungen täglich ab. Ein nicht näher definiertes Gemisch von Mikroorganismen, bestehend aus Protozoen, Bakterien und Algen, diente als Futter. Das Nährmedium dieses Gemisches ist eine Aufschlammung aus Erde und Pferdemit. Eine ähnliche Zuchtvorschrift findet sich auch bei A b d e r h a l d e n (1). Für den Test verwendete er die 0 bis 24 Stunden alten Jungen, die er täglich gewinnen konnte. Er führte den Test in einem künstlichen Testmedium durch, da er mit Leitungswasser und Wasser aus dem Zuchtansatz uneinheitliche Ergebnisse erzielt hatte. Das Testmedium besteht aus bidestilliertem Wasser, in dem pro Liter 200 mg Natriumbikarbonat, 24 mg Kaliumsulfat und 26 mg Calciumchlorid gelöst sind. Die Lösung wird 24 Stunden lang mit kohlensäurefreier Luft belüftet.

Die Daphnien, die er zum Test verwendete, wusch er zuvor mit der künstlichen Testflüssigkeit aus. Dadurch wurden die Mikroorganismen und Schwebestoffe, die den Daphnien aus dem Zuchtansatz anhafteten, weitgehend entfernt. Ehe sich die Mikroorganismen in der nährstoffarmen Testflüssigkeit zum Schaden der Daphnien vermehren können, ist der Test ohnehin beendet.

B r i n g m a n n und K ü h n umgingen solche Störungen, die luxurierendes Bakterienwachstum verursachen konnten, dadurch, daß sie den Test bei niederen Temperaturen (17°C) durchführten.

K o c h e r führte Bestimmungen von Rückständen auf Pfirsichen durch. Die Aetherextrakte wurden in Alkohol aufgenommen und der Testflüssigkeit zugesetzt, daß 0,1 g Pflanzenmaterial einem Testansatz entsprach. Gegen Diazinon und Isolan waren die Daphnien hochempfindlich, Chlorbenzilat beeinflusste sie weitaus weniger.

Über die Möglichkeit, einzelne Insektizide durch die Reaktionen, die sie an Testorganismen hervorrufen, von anderen Verbindungen dieser Wirkstoffklasse abgrenzen zu können, wurde bislang nicht so ausführlich berichtet wie über Daphnia. Nach den Angaben von allen Autoren, die Daphnia zum Test benutzt haben, ist die Empfindlichkeit von Daphnia zumindest gegenüber organischen Phosphorverbindungen höher als diejenige jedes anderen Testorganismus'. Die Angaben über die Empfindlichkeit gegenüber chlorierten Kohlenwasserstoffen schwanken. W o l l e r m a n n gibt für DDT eine höhere Toxizität an als für Parathion.

Insgesamt waren die Angaben über den Testorganismus Daphnia genügend ermutigend, um sie zur Durchführung der vorliegenden Arbeit heranzuziehen. Daphnien schienen geeignet, um in der amtlichen Lebensmittelkontrolle anderen Testorganismen vorgezogen zu werden, da wahrscheinlich gemacht wurde, durch sie Rückstände qualitativ und quantitativ zugleich erfassen zu können.

Die Arbeit stützt sich hauptsächlich auf die Angaben von S e u m e und B o y d (Zucht), W o l l e r m a n n, P u t n a m und D o w l y (Direkttest mit Pflanzensaft), K o c h e r (Direkttest mit Aetherextrakten) und W a s s e r b u r g e r und P f a f f (Empfindlichkeit und unterscheidbare Vergiftungsreaktionen).

II. Experimenteller Teil

A. Der Daphnientest.

Die Zucht von Daphnia magna (Straus).

Daphnia magna, der gemeine Wasserfloh, gehört zur Ordnung der Cladocerae, einer Untergruppe der Kleinkrebse, die zum Tierstamm der Gliederfüßer gehören. *Daphnia magna* findet sich während der warmen Jahreszeit, etwa von April bis Oktober, in großen Mengen in flachgründigen, stehenden Gewässern wie Gießwasserbecken und Ententeichen. Seine Vermehrung hängt im wesentlichen von der Nahrungsmenge ab, die er dort antrifft; daneben spielen die Einflüsse von Licht und Temperatur eine bedeutende Rolle. Ist genügend Nahrung vorhanden, erfolgt die Vermehrung vornehmlich auf parthenogenetischem Wege. Vermehrungsfähige Weibchen stoßen nach Boyd (15) bis zu 5 lebende Junge am Tage ab. Die unter günstigen Bedingungen aufwachsenden Daphnien sind kräftig dunkelbraunrot gefärbt. Daneben ist auch eine gamogenetische Vermehrung möglich. Aus der Kopulation resultieren aber nicht lebende Junge, sondern Dauererier, Ephippien genannt, die vermutlich erst Kälte und Trockenheit benötigen, ehe aus ihnen Junge hervorgehen.

Zur Zucht dienten Daphnien, die den Gießwasserbecken des Botanischen Gartens entnommen wurden. Sie wurden zusammen mit ihrem natürlichen Wohnwasser in Glasgefäße von 2 bis 5 Liter Inhalt gebracht und dort einen Tag lang gehalten. Dabei ging der größte Teil von ihnen ein. Die überlebenden weiblichen Daphnien wurden in ein Aquarium von 200 Liter Fassungsvermögen gebracht. Das Aquarium, das mit natürlichem Wohnwasser gefüllt war, wurde mit etwa 20 bis 30 Daphnien pro Liter besetzt und ständig mit einer Membranpumpe durchlüftet. Als Nahrung diente zunächst frische Bäckerhefe, die zweimal wöchentlich in Mengen von 2 bis 3 g zugesetzt wurde.

Die Populationsdichte ging innerhalb weniger Tage sichtbar zurück. Durch Stichproben wurde ermittelt, daß sie nur noch 5 bis 15 Daphnien pro Liter betrug. Gleichzeitig verschwand die kräftige Färbung. Die Vermehrung dauerte nur solange, wie die bereits vorgebildeten Jungen abgestoßen waren. Die Vermehrung konnte auch dann nicht verbessert bzw. angeregt werden, wenn häufiger und mehr gefüttert wurde. Gelegentlichen Massenvermehrungen, deren Ursache nicht ermittelt werden konnte, folgte wieder eine Abnahme des Bestandes. Während des Wachstums der Nachkommen gingen die Zuchttiere größtenteils ein, so daß nach 10 bis 15 Tagen nur noch die reduzierte Filialgeneration vorhanden und die ursprüngliche Populationsdichte wieder hergestellt war. Eine Ergänzung des Hefefutters mit frischem Rinderblut, Milch, Molke und Glukose verbesserte weder die Möglichkeit der Erhaltung frisch eingesetzter Daphnien noch ihre Vermehrung.

Um mehrere Fütterungsbedingungen gleichzeitig studieren zu können, wurde die Zucht in kleinere Gefäße verlegt. Je 20 bis 25 ausgewachsene Weibchen wurden zusammen mit Wohnwasser aus dem Aquarium in einen 250-ml-Stutzen gebracht und in der Nähe des Fensters, aber bei indirekter Beleuchtung, aufgestellt. Eine Versuchsreihe enthielt 5 Ansätze, die täglich mit einem der genannten Futterstoffe gefüttert wurden (Rinderblut 0,1 ml, Hefe 20 mg, 1 %ige Hefeextraktlösung 1 ml, Molke 1 ml, Milch 0,2 ml, Glucose 10 mg). Höhere Gaben bewirkten, daß starkes Mikroorganismenwachstum einsetzte, als dessen Folge die Daphnien sehr schnell eingingen. Durch diese Zuchtanordnung war wenigstens in einem Punkte eine Besserung eingetreten. Die ausgesetzten Daphnien ließen sich wenigstens 10 Tage lang verlustlos halten. Nach sechswöchiger Versuchsdauer schieden Blut, Milch, Molke und Glukose als ungeeignet aus, da die Vermehrungsrate unter 0,5 blieb. Den Futterzusatz zu erhöhen, war nicht möglich, da dadurch das biologische Gleichgewicht des Wohnwassers zu häufig gestört wurde. Durch Hefe und Hefeextrakt wurde eine bessere Vermehrung erzielt, ohne daß das Wohnwasser allzu oft in Fäulnis überging. Die Vermehrungsrate war sehr ungleichmäßig; sie betrug zwischen 0,5 und 2,0, der Durchschnitt lag bei 1,5. Das durchschnittliche Lebensalter war höher als

ein Monat. Zuchtansätze mit zusammen 700 bis 1000 weiblichen Daphnien würden demnach durchschnittlich 1000 bis 1500 junge Daphnien liefern, die für die Testansätze und die Weiterzucht ausreichen.

Nachdem die Arbeit von S e u m e bekannt geworden war, wurde zur Fütterung mit der einzelligen Alge Ankistrodesmus falcatus übergegangen. Die Fütterung mit Algen führte zu dem besten Vermehrungs- und Zuchterfolg. Die Vermehrungsrate betrug 2,5, die Lebensdauer betrug etwa 2 Monate, in Einzelfällen sogar bis zu 5 Monaten. Durch hohe Algengaben wurde das biologische Gleichgewicht des Wohnwassers nicht gestört. Die Fütterung konnte daher im Bedarfsfalle auf ein bis zwei Tage im voraus erfolgen.

Nach einigen Wochen der Gefangenschaft ging sowohl bei der Fütterung mit Hefe als auch mit Algen die lebhafte Pigmentierung zurück. Bei Hefefütterung waren die Farbverluste stärker als bei Algenfütterung. Die Nachkommenschaft war ebenfalls nur hellbraun gefärbt. Dies schien ein Hinweis auf die biologische Unterwertigkeit des angebotenen Futters zu sein.

In der Folge wurde versucht, mit verschiedenen Kombinationen der bislang einzeln angebotenen Futterstoffe die Daphnien zu stärkerer Pigmentbildung anzuregen. Die einzige Kombination, die eine Verbesserung bewirkte, war Hefe/Algen. Wenn sich nach etwa 1 bis 2 Wochen ein zusammenhängender Wandbelag von Algen gebildet hatte, konnte das Algenfutter weitgehend reduziert und durch Hefe ersetzt werden, ohne daß die Pigmentbildung darunter litt. Mit abnehmender Tageslänge mußte in den Wintermonaten der Algenanteil des Futters wieder erhöht werden.

Durch Fütterung mit der Hefe/Algen-Kombination waren zunächst eine befriedigende Vermehrungsrate, eine weitgehende Erhaltung der Pigmente und eine lange Lebensdauer der im Freien gefangenen Daphnien gesichert. Der Zuchtüberschuß, d.h. diejenigen Daphnien, die nicht zum Test benötigt wurden, wurde in das Aquarium gebracht und mit Hefe/Algen gefüttert. Hier ließen sich jedoch die Ergebnisse, die in den kleinen Gläsern erzielt wurden, nicht erzielen. Es trat gegenüber der vorigen Aquariumszucht lediglich eine leichte Verbesserung ein, indem die Popu-

lationsdichte leicht - auf 15 bis 25 - anstieg. Da das Aquarium in einiger Entfernung vom Fenster angebracht werden mußte, konnte angenommen werden, daß dem Licht ein entscheidender Einfluß auf die Vermehrung zuzusprechen ist. Künstliche Lichtquellen, bestehend aus der Deckenbeleuchtung und zwei seitlich angebrachten 150 Watt-Lampen, konnten aber die Vermehrungsrate nicht wesentlich beeinflussen. Wurde dagegen umgekehrt ein Teil der Zuchtgläser künstlich teilweise verdunkelt, ließ die Vermehrung um durchschnittlich 50 % nach, ohne aber ganz aufzuhören. Als weiterer begrenzender Faktor wurde daraufhin die Größe der Zuchtgefäße angenommen. Wie in den vorausgegangenen Zuchtversuchen wurden frisch gefangene weibliche Daphnien, die vereinzelt Ansätze von Embryonen zeigten, in Stutzen von 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 Litern gebracht, in Fensternähe aufgestellt und mit der Hefe/Algen-Kombination gefüttert. In den Stutzen von 0,5 bis 2 Liter wurden dieselben Ergebnisse wie in den kleineren Gefäßen erzielt. Ab 5 Liter Zuchtraum wurden die Ergebnisse zunehmend ungünstiger. Vor allem ließ sich dort die Populationsdichte nicht aufrechterhalten. Im 20-l-Gefäß hatte sie sich innerhalb eines Monats um 80 % verringert.

Wegen ihrer Handlichkeit wurden nun in der Folge 1-l-Steilbrustflaschen als Zuchtgefäße verwendet. Sie wurden mit je 100 bis 120 halbwüchsigen weiblichen Daphnien besetzt. Nach drei bis vier Tagen setzte dann die Vermehrung langsam ein und hatte nach weiteren vier Tagen die Rate von 2,5 bis 3 erreicht. Aus 10 Zuchtgefäßen wurden täglich weitaus mehr Nachkommen erhalten, als für den Test benötigt wurden. Der Überschuss wurde entweder ins Aquarium gebracht oder in anderen Gefäßen geeigneter Größe weitergezüchtet.

Die Nachkommenschaft war hinsichtlich des Verhältnisses der Geschlechter weitgehend gleichmäßig zusammengesetzt. Auf 3 bis 4 weibliche Daphnien entfiel eine männliche Daphnie. Wenn nach 10 bis 15 Tagen die Geschlechtsreife eintrat, erfolgte Befruchtung und Bildung eines Dauereis. Bei genauer Beobachtung ließen sich jedoch schon nach 5 bis 6 Tagen Lebensalter die Geschlechter voneinander unterscheiden.

Die weiblichen Daphnien sind von der Seite betrachtet elliptisch mit einem Hohlraum auf dem Rücken und sind durchweg $1/4$ bis $1/3$ größer als gleich alte männliche Daphnien. Sie führen gleichmäßige, schräg nach oben gerichtete Schwimmstöße aus und sinken zwischen zwei Schwimmstößen nahezu um dieselbe Strecke wieder zurück. Die männlichen Daphnien zeichnen sich durch einen mehr keilförmigen Körperbau aus, sie sind stärker gefärbt und bewegen sich intensiver oder verharren minutenlang an einer Stelle der Gefäßwand.

Diese Merkmale reichten aus, um männliche von weiblichen Daphnien vor Eintritt der Geschlechtsreife mit mehr als 90 %iger Sicherheit abzutrennen. Die restlichen 10 % männliche Daphnien konnten an den folgenden Tagen ermittelt und entfernt werden. Mit weniger Aufwand und geringerer Sicherheit ließen sich die Geschlechter durch Absieben voneinander trennen. In einem Zuchtansatz von gleich alten Daphnien kommt der Umstand zu Hilfe, daß männliche Daphnien unter den gegebenen Bedingungen eine Lebensdauer von höchstens vier Wochen haben.

Das Auftreten von männlichen Daphnien in der Nachkommenschaft besagt nach S e u m e , daß die Zuchtbedingungen in den Gläsern noch nicht optimal waren. Die von S e u m e beschriebenen Intermediärweibchen konnten aber trotz reichlichen Algenfutters in mehreren nacheinander versuchten Ansätzen nicht erhalten werden. Durch Zusätze von physiologisch wirksamen Spurenelementen , Vitamin E, C und einigen Vertretern der B-Gruppe wurde versucht, die ausschließliche Bildung von weiblichen Nachkommen anzuregen. Folgende Spurenelemente und Vitamine wurden zugesetzt: Kupfersulfat, Ammoniummolybdat, Arsentrioxyd und Zinksulfat in der Konzentration 10^{-10} g/ml und Nickelsulfat, Cobaltsulfat, Eisensulfat, Mangansulfat und Borax in der Konzentration 10^{-9} g/ml in der Woche, Vitamin E, Folsäure, Pantothen-säure und Biotin in der Konzentration 10^{-7} g/ml, Vitamin B₁ und B₂ in der Konzentration 2×10^{-7} g/ml und Vitamin C in der Konzentration 10^{-6} g/ml jeden Tag. Es wurden Zuchtreihen mit einen Tag alten Daphnien angesetzt, im übrigen wurde verfahren, wie bei den Fütterungsversuchen beschrieben.

In der Nachkommenschaft hatten sich die Mengenverhältnisse zwischen männlichen und weiblichen Daphnien nicht verschoben. In anderer Richtung konnte hingegen eine Verbesserung beobachtet werden. Vitamin E allein, die Kombinationen der übrigen Vitamine mit Vitamin E, die Kombination Vitamin B₁, Folsäure und Biotin und die Kombination Folsäure und Biotin bewirkten eine auffallende Verstärkung der Pigmentbildung. Vitamin E und seine Kombinationen ließen ausserdem die Geschlechtsreife schon nach 8 bis 10 Tagen eintreten. Die Vermehrungsrate konnte nicht wesentlich gesteigert werden. Der Zusatz der Spurenelemente hatte keinen Einfluß.

E r g e b n i s :

Daphnien, die ihrer natürlichen Umgebung entnommen werden, lassen sich nicht ohne weiteres unter Laboratoriumsbedingungen weiterzüchten, da ein großer Teil von ihnen schon innerhalb eines Tages eingeht. Ihr natürliches Wohnwasser verarmt sehr schnell an Nahrungsstoffen, so daß sie künstlich ernährt werden müssen. Futterstoffe, die hauptsächlich Eiweiß und Aminosäuren enthalten, sind nicht vollwertig. Ihr Zusatz kann nur innerhalb eng gezogener Grenzen erfolgen. Ein kombiniertes Futter, das aus Hefe und der einzelligen Alge *Ankistrodesmus falcatus* zusammengesetzt ist und Zusätze von Vitamin E, B₁, B₂, C, Biotin, Folsäure und Pantothensäure enthält, läßt in Gefäßen unter 2 Liter Inhalt eine erfolgreiche Nachzucht erwarten. Die Nachkommenschaft ist zu 20 bis 30 % aus männlichen und zu 70 bis 80 % aus weiblichen Daphnien zusammengesetzt und voll lebensfähig. In ihrer Größe und Ausbildung der Pigmente unterscheiden sie sich nur wenig von Daphnien in natürlicher Umgebung. Licht ist neben dem Futter ein begrenzender Faktor für die Lebensfähigkeit und die Vermehrung.

Aus den genannten Ergebnissen läßt sich ein Zuchtschema ableiten, das dem Verfahren von B o y d folgt. 100 bis 200 in der Zucht gewonnene halbwüchsige Weibchen werden mit Wohnwasser in 1-l-Steilbrustflaschen gebracht. Sobald Nachkommen erscheinen, werden sie täglich mit Hilfe eines Maschensiebes getrennt, das die Zuchttiere zurückhält, die Jungen aber

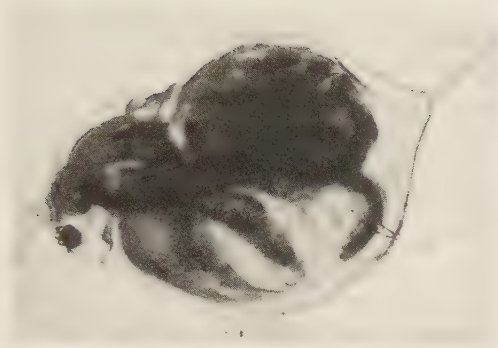


Abb. 1 Weiblicher Wasserfloh, etwa 2 Monate alt,
mit Embryonenpaket. Vergr. etwa 50-fach linear.

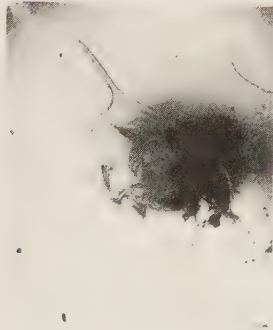


Abb. 2 Junger Wasserfloh, zwischen 0 und 24 Std. alt.
Vergr. etwa 50-fach linear.

Anmerkung: Die Größenverhältnisse zwischen Embryonen und gerade geborenen Daphnien lassen den Schluß zu, daß die Schale, die sich bis in die feinsten Verzweigungen der Antennen fortsetzt, erst nach der Geburt entfaltet wird. Abb. 2 läßt erkennen, daß die Schalen nach unten geöffnet sind.

durchläßt. Diese robuste Trennung wird vor allem von den Jungen ohne Schaden vertragen. Die Jungen werden auf einem darunterliegenden Sieb gesammelt und in ein geeignetes Gefäß gebracht. Nach dem Absieben werden das Futter und die Vitamine zugesetzt. Die Vitaminlösungen werden kurz zuvor aus höher konzentrierten Stammlösungen täglich frisch hergestellt. Werden junge Daphnien nachgezüchtet, können sie an den ersten beiden Lebenstagen ohne Verluste in einer Dichte von 2000 pro Liter gehalten werden. Danach ist es notwendig, sie auf mehrere Zuchtgefäße zu verteilen. Wenn die Geschlechter unterschieden werden können, werden die Daphnien mit einer geeigneten Pipette aussortiert. Die männlichen Daphnien werden verworfen. Die Ansätze mit den jungen weiblichen Daphnien werden noch 2 bis 3 Tage lang auf Vollständigkeit der Trennung überprüft. Wenn nach 4 bis 5 Wochen die Zuchttiere um die Hälfte zurückgegangen sind, werden zwei Ansätze vereinigt, um die ursprüngliche Populationsdichte wieder herzustellen. Daphnien, die weder zum Test noch zur Nachzucht verwendet werden, werden in das Aquarium überführt. Im Aquarium sollen zur Sicherheit immer so viele Daphnien sein, daß beim Mißlingen der Nachzucht oder bei anderen Störungen mehrere Zuchtansätze von dort erhalten werden können. Bei dieser doppelten Sicherung stehen jederzeit genügend Testtiere zur Verfügung.

Zucht von Ankistrodesmus falcatus.

S e u m e gibt eine Vorschrift zur Zucht von Ankistrodesmus falcatus an. Die Kulturflüssigkeit besteht aus einer Lösung von 550 mg Kaliumnitrat, 110 mg Magnesiumsulfat, 40 mg Dikaliumhydrogenphosphat, 10 mg Eisenzitrat und 10 mg Zitronensäure pro Liter. Dazu kommen 50 ml eines Erddekoktes. Das Dekokt wird durch Erhitzen im Autoklaven von einem Teil komposterde und zwei Teilen Wasser, nachfolgendes Abgießen der überstehenden Flüssigkeit und nochmaliges Sterilisieren hergestellt. Die Algen, die aus der Algensammlung Fringsheim, Göttingen, erhältlich sind, werden in einem kleinen Gefäß vorgezüchtet und in den Zuchtansatz überführt, wenn sie sich sichtbar vermehrt haben.

Die Ergebnisse waren nach den Angaben von S e u m e nicht zufriedenstellend. Durch das Erddekokt bildete sich nach und nach ein voluminöser Niederschlag, der die Algen adsorbierte und an der weiteren Vermehrung hinderte. Die Algen sedimentierten sehr schnell oder schlugen sich an der Gefäßwand nieder, auch wenn das Erddekokt weggelassen und durch Spurenelemente ersetzt wurde. Die Algenzucht gelang erst zufriedenstellend, als sie in Glasröhren durchgeführt wurde, durch die von unten ein kohlenstoffhaltiger Luftstrom durchgeleitet und die beidseitig beleuchtet wurden. Die Abmessungen der Glasröhren betrugen 80 x 700 mm, an ihren unteren, verjüngten Enden waren sie mit einer G3 - Fritte verschlossen, durch die das Gasgemisch eingeleitet wurde.

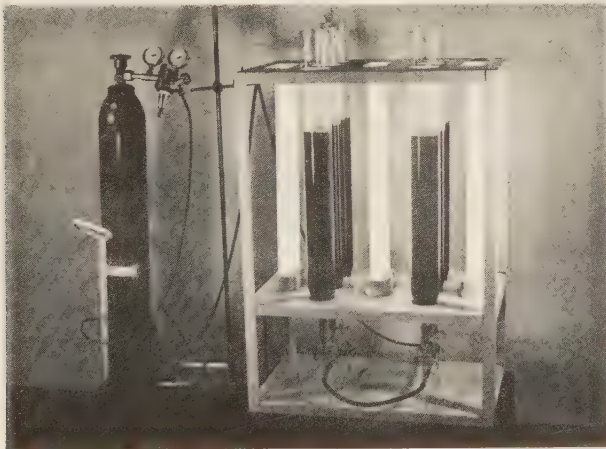


Abb. 3 Einrichtung zur Zucht von einzelligen Algen.
v.l.n.r.: Kohlenstoffflasche, Woulffsche
Flasche, Wisa - Membranpumpe, Halterungsge-
stell mit Leuchtstoffröhren und Glasröhren;
weitere Erklärungen siehe Text.

Die Röhren wurden in einem Halterungsgestell, das zugleich die Leuchtröhren trug, nebeneinander befestigt und unten durch T - Stücke miteinander verbunden. Die Röhren wurden zu zwei Dritteln mit Kulturflüssigkeit gefüllt und beimpft. Das Gasgemisch wurde in einer Woulff'schen Flasche vorgemischt. Der Kohlensäurestrom wurde so reguliert, daß durch ein 4 mm weites Glasrohr etwa 4 bis 6 Blasen pro Sekunde austraten. Die Wassertemperatur regulierte sich von selbst auf 22° bis 25°C ein.

In der Zucht siedeln sich sehr schnell wilde Chlorella und andere unerwünschte Algen an. Ihrem Überhandnehmen kann nur dadurch begegnet werden, daß der Zuchtansatz aus einer neuen Vorkultur begonnen wird. Bei der Herstellung der Vorkultur muß unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Als Zuchtgefäß für die Vorkultur kann ein Chromatographierohr von 20 x 400 mm dienen. Das Gasgemisch wird durch konzentrierte Schwefelsäure und einen Trockenturm geleitet, der mit Watte und granulierter Aktivkohle beschickt ist.

E r g e b n i s :

Die Zucht von *Ankistrodesmus falcatus* verläuft zufriedenstellend, wenn durch die Zuchtansätze ständig ein mit Kohlensäure beladener Luftstrom durchgeleitet wird. Werden Daphnien und Algen in einem Raum gezüchtet, muß der Raum ständig gut durchlüftet sein und die Kohlensäure abgestellt werden, wenn die Daphnien belüftet werden müssen.

Orientierende Untersuchungen über die Empfindlichkeit von *Daphnia magna*.

Die orientierenden Untersuchungen entsprachen dem jeweiligen Stand der Erkenntnisse im Umgang mit Daphnien und dem Stand der Zuchtergebnisse. Zu Beginn wurde von unsortierten Populationen ausgegangen, die in Gießwasserbecken gefangen worden waren. Später wurden nur weibliche Daphnien von 1,5 bis 2 mm Länge verwendet, die noch keine Embryonen trugen. Für die quantitativen Untersuchungen wurden einen Tag alte Daphnien verwendet.

Der Einfluß von Lösungs- und Extraktionsmitteln und Formulierungsgemischen.

Untersuchungen über den Einfluß von organischen Lösungsmitteln und Formulierungsgemischen waren notwendig, weil die Wirkstoffe den Testansätzen in gelöster Form zugesetzt werden mußten, um die gewünschten geringen Mengen genau dosieren zu können.

Zunächst wurden Aethanol und Aceton, die nach K o c h e r (86) als gut verträglich bezeichnet werden, untersucht. Je 0,5, 1,0, 2,0 und 5,0 ml der frisch destillierten Lösungsmittel wurden in hohe 150 ml-Bechergläser pipettiert, in denen sich bereits 20 Daphnien und 50 ml Wohnwasser befanden. Unmittelbar nach ihrem Zusatz wurde das Volumen mit Wohnwasser auf 100 ml ergänzt. Somit entsprach die Konzentration der Lösungsmittel 0,5 bis 5,0 x 10⁻² ml/ml Testflüssigkeit. Die erste Reaktion der Daphnien war bei beiden Lösungsmitteln und bei allen Konzentrationen ein K.o.-Effekt. Die Tiere verstärkten ihre Bewegungen, verlagerten ihren Bewegungsraum in das untere Viertel der Testgläser und blieben teilweise bewegungslos am Gefäßboden liegen. Bei 0,5 bis 2,0 x 10⁻² ml/ml Aethanol und 0,5 x 10⁻² ml/ml Aceton erholten sich die Daphnien innerhalb von 5 bis 15 Minuten wieder und blieben wenigstens einen Tag lang am Leben. Die höheren Zusätze wurden nicht vertragen und verursachten den Tod. Bei einem vorhergehenden Versuch wurde mit 0,5 % Petroläther vergällter Alkohol statt reinen Alkohols verwendet. Dabei zeigte sich, daß die Wirkung des Ver-

gällungsmittels falsch eingeschätzt worden war, nachdem die Daphnien innerhalb von 15 Minuten eingegangen waren.

Daraufhin wurde die Wirkung einiger lipoidlöslicher Lösungsmittel untersucht, die für die Extraktion und Aufarbeitung von Rückständen infrage kamen. Die Zusätze von je einem Tropfen Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Methylenchlorid und Äther töteten die Daphnien innerhalb weniger Minuten ab. - Ein Tropfen entspricht etwa 2×10^{-4} ml/ml. - Zusätze von 5×10^{-5} ml/ml hatten innerhalb einer Stunde eine letale Wirkung. Desgleichen gingen die Daphnien in Testgläsern ein, die mit den Lösungsmitteln ausgespült worden und in die Daphnien gebracht worden waren, ehe die Lösungsmitteldämpfe vollständig entfernt waren.

Dieser Befund ist bedeutsam bei der Durchführung eines Direkttests mit ungereinigten Extrakten nach K o c h e r , da angenommen werden kann, daß die lipoiden Extraktstoffe Reste von Lösungsmitteln festzuhalten vermögen.

Von P f a f f (130) wurde ein Formulierungsgemisch angegeben, das neben Aceton und Alkohol einen tweenähnlichen Lösungsvermittler enthielt. Daraufhin wurde die Verträglichkeit von Tweenzusätzen überprüft. Tween 80 wurde zu 10 % in Wasser gelöst und in Konzentrationen von 10^{-4} g/ml bis 2×10^{-3} g/ml auf die Daphnien einwirken gelassen. Es zeigte sich, daß von der Konzentration 5×10^{-4} g/ml abwärts Tween 80 über mehrere Tage vertragen wurde.

E r g e b n i s s :

Die Ergebnisse, die mit einigen Lösungsmitteln erzielt wurden, lassen Äthanol oder Äthanol/Tween 80 als Lösungsmittel für die Herstellung von Stammlösungen geeignet erscheinen. Der unerwartet starke Wirkungsgrad einiger lipophiler Lösungsmittel läßt äußerste Vorsicht bei ihrer Handhabung in Räumen geraten sein, in denen sich Daphnien befinden.

Die Ergebnisse waren nach den Angaben von S e u m e nicht zufriedenstellend. Durch das Erddekokt bildete sich nach und nach ein voluminöser Niederschlag, der die Algen adsorbierte und an der weiteren Vermehrung hinderte. Die Algen sedimentierten sehr schnell oder schlugen sich an der Gefäßwand nieder, auch wenn das Erddekokt weggelassen und durch Spurenelemente ersetzt wurde. Die Algenzucht gelang erst zufriedenstellend, als sie in Glasröhren durchgeführt wurde, durch die von unten ein kohlenstoffhaltiger Luftstrom durchgeführt und die beidseitig beleuchtet wurden. Die Abmessungen der Glasröhren betrugen 80 x 700 mm, an ihren unteren, verjüngten Enden waren sie mit einer G3 - Fritte verschlossen, durch die das Gasgemisch eingeleitet wurde.

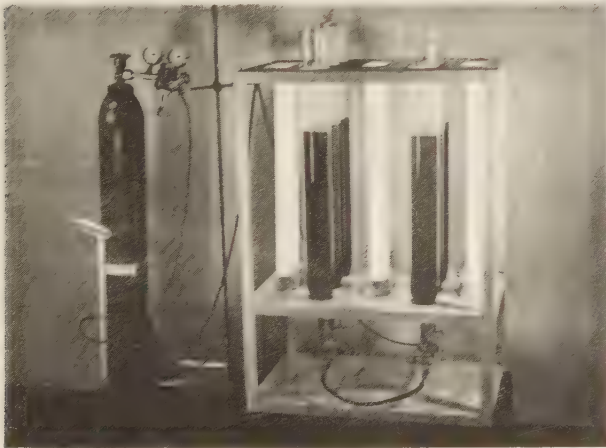


Abb. 3 Einrichtung zur Zucht von einzelligen Algen.
v.l.n.r.: Kohlenstoffflasche, Woulffsche
Flasche, Wisa - Membranpumpe, Halterungsge-
stell mit Leuchtstoffröhren und Glasröhren;
weitere Erklärungen siehe Text.

Die Röhren wurden in einem Halterungsgestell, das zugleich die Leuchtröhren trug, nebeneinander befestigt und unten durch T - Stücke miteinander verbunden. Die Röhren wurden zu zwei Dritteln mit Kulturflüssigkeit gefüllt und beimpft. Das Gasgemisch wurde in einer Woulff'schen Flasche vorgemischt. Der Kohlensäurestrom wurde so reguliert, daß durch ein 4 mm weites Glasrohr etwa 4 bis 6 Blasen pro Sekunde austraten. Die Wassertemperatur regulierte sich von selbst auf 22° bis 25°C ein.

In der Zucht siedeln sich sehr schnell wilde *Chlorella* und andere unerwünschte Algen an. Ihrem Überhandnehmen kann nur dadurch begegnet werden, daß der Zuchtansatz aus einer neuen Vorkultur begonnen wird. Bei der Herstellung der Vorkultur muß unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Als Zuchtgefäß für die Vorkultur kann ein Chromatographierohr von 20 x 400 mm dienen. Das Gasgemisch wird durch konzentrierte Schwefelsäure und einen Trockenturm geleitet, der mit Watte und granulierter Aktivkohle beschickt ist.

E r g e b n i s s :

Die Zucht von *Ankistrodesmus falcatus* verläuft zufriedenstellend, wenn durch die Zuchtansätze ständig ein mit Kohlensäure beladener Luftstrom durchgeleitet wird. Werden Daphnien und Algen in einem Raum gezüchtet, muß der Raum ständig gut durchlüftet sein und die Kohlensäure abgestellt werden, wenn die Daphnien belüftet werden müssen.

Orientierende Untersuchungen über die Empfindlichkeit von *Daphnia magna*.

Die orientierenden Untersuchungen entsprachen dem jeweiligen Stand der Erkenntnisse im Umgang mit Daphnien und dem Stand der Zuchtergebnisse. Zu Beginn wurde von unsortierten Populationen ausgegangen, die in Gießwasserbecken gefangen worden waren. Später wurden nur weibliche Daphnien von 1,5 bis 2 mm Länge verwendet, die noch keine Embryonen trugen. Für die quantitativen Untersuchungen wurden einen Tag alte Daphnien verwendet.

Der Einfluß von Lösungs- und Extraktionsmitteln und Formulierungsgemischen.

Untersuchungen über den Einfluß von organischen Lösungsmitteln und Formulierungsgemischen waren notwendig, weil die Wirkstoffe den Testansätzen in gelöster Form zugesetzt werden mußten, um die gewünschten geringen Mengen genau dosieren zu können.

Zunächst wurden Aethanol und Aceton, die nach K o c h e r (86) als gut verträglich bezeichnet werden, untersucht. Je 0,5, 1,0, 2,0 und 5,0 ml der frisch destillierten Lösungsmittel wurden in hohe 150 ml-Bechergläser pipettiert, in denen sich bereits 20 Daphnien und 50 ml Wohnwasser befanden. Unmittelbar nach ihrem Zusatz wurde das Volumen mit Wohnwasser auf 100 ml ergänzt. Somit entsprach die Konzentration der Lösungsmittel $0,5$ bis $5,0 \times 10^{-2}$ ml/ml Testflüssigkeit. Die erste Reaktion der Daphnien war bei beiden Lösungsmitteln und bei allen Konzentrationen ein K.o.-Effekt. Die Tiere verstärkten ihre Bewegungen, verlagerten ihren Bewegungsraum in das untere Viertel der Testgläser und blieben teilweise bewegungslos am Gefäßboden liegen. Bei $0,5$ bis $2,0 \times 10^{-2}$ ml/ml Aethanol und $0,5 \times 10^{-2}$ ml/ml Aceton erholten sich die Daphnien innerhalb von 5 bis 15 Minuten wieder und blieben wenigstens einen Tag lang am Leben. Die höheren Zusätze wurden nicht vertragen und verursachten den Tod. Bei einem vorhergehenden Versuch wurde mit 0,5 % Petrolaether vergällter Alkohol statt reinen Alkohols verwendet. Dabei zeigte sich, daß die Wirkung des Ver-

gällungsmittels falsch eingeschätzt worden war, nachdem die Daphnien innerhalb von 15 Minuten eingegangen waren.

Daraufhin wurde die Wirkung einiger lipoidlöslicher Lösungsmittel untersucht, die für die Extraktion und Aufarbeitung von Rückständen infrage kamen. Die Zusätze von je einem Tropfen Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Methylenchlorid und Äther töteten die Daphnien innerhalb weniger Minuten ab. - Ein Tropfen entspricht etwa 2×10^{-4} ml/ml. - Zusätze von 5×10^{-5} ml/ml hatten innerhalb einer Stunde eine letale Wirkung. Desgleichen gingen die Daphnien in Testgläsern ein, die mit den Lösungsmitteln ausgespült worden und in die Daphnien gebracht worden waren, ehe die Lösungsmitteldämpfe vollständig entfernt waren.

Dieser Befund ist bedeutsam bei der Durchführung eines Direkttests mit ungereinigten Extrakten nach K o c h e r , da angenommen werden kann, daß die lipoiden Extraktstoffe Reste von Lösungsmitteln festzuhalten vermögen.

Von P f a f f (130) wurde ein Formulierungsgemisch angegeben, das neben Aceton und Alkohol einen tweenähnlichen Lösungsvermittler enthielt. Daraufhin wurde die Verträglichkeit von Tweenzusätzen überprüft. Tween 80 wurde zu 10 % in Wasser gelöst und in Konzentrationen von 10^{-4} g/ml bis 2×10^{-3} g/ml auf die Daphnien einwirken gelassen. Es zeigte sich, daß von der Konzentration 5×10^{-4} g/ml abwärts Tween 80 über mehrere Tage vertragen wurde.

E r g e b n i s s :

Die Ergebnisse, die mit einigen Lösungsmitteln erzielt wurden, lassen Äthanol oder Äthanol/Tween 80 als Lösungsmittel für die Herstellung von Stammlösungen geeignet erscheinen. Der unerwartet starke Wirkungsgrad einiger lipophiler Lösungsmittel läßt äußerste Vorsicht bei ihrer Handhabung in Räumen geraten sein, in denen sich Daphnien befinden.

Schwermetallsalze, organische Fungizide und Konservierungsmittel.

Da die Möglichkeit besteht, daß in einen Testansatz nach W o l l e r m a n (163) und D o w l y (41) anorganische und organische Fungizide gelangen können oder daß in verarbeiteten Lebensmitteln, die im Daphnientest geprüft werden sollen, Konservierungsmittel vorhanden sein können, wurden die wichtigsten Fungizide, einige Schwermetallsalze und Konservierungsmittel in die orientierenden Voruntersuchungen einbezogen. Es wurde von Stammlösungen ausgegangen, die 10^{-3} g/ml Wirkstoffe enthielten. Die Wirkstoffe wurden in arithmetischer Progression mit der Differenz 5 den Testansätzen zugesetzt. Als Testtiere dienten weibliche Daphnien von 1,5 mm bis 2,0 mm Länge ohne Embryonen.

Für eine Konzentrationsstufe wurden 5 x 20 Daphnien in 150 ml-Bechergläsern angesetzt. Die Wirkung wurde nach 24 Stunden beobachtet. Als wirksame Grenzkonzentration wurde die Konzentrationsstufe angesehen, in der die Daphnien zu wenigstens 90 % (DL_{90}) eingegangen waren.

E r g e b n i s s e :

Tab. 2

Wirkstoff	Grenzkonzentration (g/ml)	Wirkstoff	Grenzkonzentration (g/ml)
Captan	10^{-6}	CuSO ₄	5×10^{-7}
Maneb	5×10^{-6}	AgNO ₃	5×10^{-7}
Zineb	5×10^{-6}	HgCl ₂	5×10^{-7}
Ziram	5×10^{-7}	Pb(NO ₃) ₂	10^{-6}
Sorbinsäure	10^{-4}	CdCl ₂	5×10^{-6}
Benzoesäure	5×10^{-5}	K ₂ Cr ₂ O ₇	5×10^{-6}
PHB-Methylester	5×10^{-5}	ZnSO ₄	10^{-6}
MnSO ₄	10^{-5}	FeSO ₄	5×10^{-5}

Die Ergebnisse, die mit den Schwermetallsalzen erzielt wurden, lassen sich nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen von **B r i n g m a n n** und **K ü h n** (17) vergleichen. Diejenigen Schwermetallsalze, die auch gegen den Menschen toxisch wirken, lassen eine starke Wirksamkeit gegenüber Daphnien erkennen. Die organischen Fungizide sind ebenfalls recht toxisch gegen Daphnien. Die Konservierungsmittel können dagegen als wirkungslos bezeichnet werden. Im Direkttest besteht die Möglichkeit einer Störung durch Kupfersulfat und Ziram.

Insektizide.

Bei den Insektiziden wurde zunächst die Abhängigkeit des Wirkungsgrades von der Konzentration des Wirkstoffes und der Anzahl der Daphnien, die sich in einem Testansatz befanden, überprüft. Nachdem festgestellt war, daß der Wirkungsgrad von der Konzentration eines Wirkstoffes und nicht von einer bestimmten Menge in einem beliebigen Volumen abhängig ist, wurden die Grenzkonzentrationen, wie unter "Fungizide" beschrieben, ermittelt. Im Bereich der nach 20 bis 30 Stunden letalen Konzentrationen wurde die Differenz auf 2 Zahlenwerte verringert. Im Bereich zwischen 10 und 50 Daphnien pro Testglas konnte kein Unterschied im Wirkungsgrad einer Konzentration gefunden werden.

Tab. 3 Grenzkonzentrationen.

Wirkstoff	g/ml	Wirkstoff	g/ml
Aldrin	10^{-6}	Toxaphen	5×10^{-7}
Alodan	5×10^{-7}	Chlorthion	10^{-8}
Chlorbenzilat	10^{-6}	Diazinon	8×10^{-9}
Dieldrin	2×10^{-7}	Gusathion	5×10^{-9}
DDT	10^{-7}	Parathion	5×10^{-9}
Endrin	5×10^{-7}	Phosdrin	8×10^{-9}
Gamma-HCH	8×10^{-7}	Phosphamidon	5×10^{-8}
Thiodan	5×10^{-7}	Malathion	2×10^{-8}

Vergiftungsbewegungen.

Bei der Bestimmung der Grenzkonzentrationen waren unterschiedliche Reaktionen und Bewegungen beim Vergiftungsablauf aufgefallen, wie nach K ä m p f e (80) zu erwarten gewesen war. Die von W a s s e r b u r g e r (157,158) und P f a f f (130) beschriebenen spezifischen Charakteristika konnten dagegen nicht beobachtet werden. Es wurde angenommen, daß die Versuchsanordnung der Bestimmung der Grenzkonzentrationen für solche Beobachtungen nicht optimal war. Der Versuchsplan wurde daraufhin so abgeändert, daß bei der vergleichenden Untersuchung zweier Insektizide die Konzentrationen gewählt wurden, die einen gleichzeitigen Eintritt des Vergiftungsablaufes erwarten ließen. Zwei mal fünf Testgläser, die mit je 10 Daphnien besetzt waren, wurden in arithmetischer Progression mit der Differenz 2 mit den Wirkstoffen versetzt. Dadurch wurde in den meisten Fällen bei wenigstens je einem Glas der beiden Testreihen befriedigende zeitliche Übereinstimmung erreicht. Im Verlaufe der Untersuchungen wurde die Anzahl der Daphnien in einem Testglas auf 3 verringert, weil die Beobachtung von 10 Daphnien gleichzeitig sehr verwirrend war. In die vergleichenden Untersuchungen wurden auch die Carbamate Isolan und Sevin einbezogen.

E r g e b n i s s e :

Werden Daphnien unter die Einwirkung einer insektiziden organischen Phosphorverbindung gebracht, gehen nach einiger Zeit ihre gleichförmigen, stoßartigen Schwimmbewegungen in eine Reihe andersartiger Bewegungen über. Der sichtbare Beginn der Giftwirkung ist durch gelegentliches Schwimmen in Rückenlage gekennzeichnet und schwer zu erkennen. Als nächstes Stadium folgen pfeilschnelle Geradeausbewegungen in Rücken- oder Normallage, die spontan erfolgen oder durch Zusammenstoß mit der Gefäßwand oder anderen Daphnien ausgelöst werden. Danach werden meist wieder eine Reihe von normalen Schwimmstößen ausgeführt. Mit fortschreitender Zeit werden die zwischenzeitlichen Normal-

bewegungen vereinzelter, bis sie schließlich nicht mehr zu beobachten sind. Die Daphnien schießen völlig unorientiert kreuz und quer im Wasser umher. Kommt eine Daphnie in diesem Zustand der Vergiftung an die Wasseroberfläche, stellt sie die Bewegungen ein und sinkt langsam zu Boden. Der Aufprall ist dann meist ein neuerlicher Reiz, der eine weitere Folge von Bewegungen auslöst. Nach weiterer Schädigung können die Daphnien trotz zunehmender Intensität der Bewegungen keine längeren Strecken mehr durchschwimmen. Die Geradeausbewegungen gehen in eine Folge von immer enger werdenden Kreisen in der Nähe des Gefäßbodens über. Die lokomotorischen Bewegungen enden in sehr heftigem Bewegen um die eigene Achse auf dem Gefäßboden. Nach dieser zweidimensionalen Phase werden noch lange Zeit die Antennen bewegt; dabei befinden sich die Daphnien in Rückenlage. Wenn kein äußerer Reiz auf sie einwirkt, verenden sie in dieser Lage meist, ohne noch einmal dreidimensionale Bewegungen aufzunehmen. Die Übergänge in die einzelnen Phasen sind nicht scharf abgrenzbar, zumal einzelne Phasen in umgekehrter Reihenfolge auftreten oder übergangen werden können. Für einen Ansatz mit 10 bis 20 Daphnien gilt aber der oben angegebene Vergiftungsablauf. Die Vergiftungssymptome sind nicht von der Konzentration abhängig, sie treten um so später auf und dauern um so länger an, je niedriger die Konzentration des Wirkstoffes ist, der sie auslöst.

Bei der Einwirkung von Carbamaten geht dem Vergiftungsablauf ein K.o.-Effekt voraus. Die Daphnien tänzeln in unmittelbarer Nähe des Gefäßbodens, einzelne schießen zur Oberfläche hoch und kehren ebenso schnell wieder zurück. Danach werden die Bewegungen wieder ruhiger und ähneln in der Folge mehr den Bewegungen, die durch Phosphorverbindungen ausgelöst werden.

Die chlorierten Kohlenwasserstoffe verursachen in den ersten Phasen des Vergiftungsablaufes andersartige Reaktionen. Die Daphnien sammeln sich in dem unteren Drittel des Gefäßes, das dem Licht zugewandt ist, beginnen allmählich in Rückenlage zu schwimmen und streben dann mehr in das obere Drittel. Schließlich kommen sie unmittelbar unter die Wasseroberfläche und beginnen dort in weiten, horizontalen Kreisen zu schwimmen. Dort beginnen sie

mit den Zickzack- und Kreisbewegungen, die wieder über den ganzen Raum verteilt sind. Der weitere Vergiftungsablauf ist dem sehr ähnlich, der durch Phosphorverbindungen und Carbamate hervorgerufen wird.

Während der Vergiftungsablauf bei Phosphorverbindungen und Carbamaten mit abnehmenden Konzentrationen lediglich eine zeitliche Verschiebung erfährt, unterscheidet er sich bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen auch qualitativ dadurch, daß die anfänglichen Exzitationsphasen kaum mehr von denjenigen zu unterscheiden sind, die durch die Hemmstoffe der Cholinesterase hervorgerufen werden. Die gegenüber jenen geringere Intensität der Bewegungen kann jedoch dem Befund keine vollgültige Aussagekraft mehr verleihen.

Nach diesen Ergebnissen müssen die Bedenken, die K ä m p f e schon geäußert hatte, erneut angemeldet werden. Seine vorsichtigen Deutungen der Befunde, die er erhalten hatte, können übernommen werden. Einzelne Verbindungen einer ähnlich gebauten und gleichartig wirkenden Gruppe lassen sich im Daphnientest nicht voneinander abgrenzen und charakterisieren. Die Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe läßt sich in einem Konzentrationsbereich, der die letale Wirkung innerhalb 4 bis 5 Stunden herbeiführt, von den Hemmstoffen der Cholinesterase unterscheiden.

Die Schwermetallsalze und organischen Fungizide lösen kein charakteristisches Vergiftungsbild aus. Sie bewirken zunehmend schwächer werdende Bewegungen, wobei sich der Bewegungsraum der Daphnien immer mehr nach dem Gefäßboden zu verlagert. Die Daphnien verenden ohne jegliches Exzitationsstadium in Rückenlage. Diese Art des Absterbens wird durch alle unphysiologischen Zusätze zum Testmedium ausgelöst. Unphysiologisch sind beispielsweise höhere Konzentrationen fester, gelöster Stoffe als 0,1 % und pH-Bereiche, die unter 5,5 und über 8,5 liegen.

Die chlorierten Kohlenwasserstoffe sind deutlich weniger wirksam als die Hemmstoffe der Cholinesterase. Ihr Wirkungsgrad überschneidet sich mit dem einiger Schwermetallsalze und Fungizide. Sie können mit Ausnahme von DDT als relativ schwach

wirksam beurteilt werden. Stellt man die Überlegung an, es befinde sich 1 ppm eines chlorierten Kohlenwasserstoffes auf dem Untersuchungsgut und der Test möge mit 5 x 20 Daphnien in 5 x 100 ml Testflüssigkeit durchgeführt werden, dann muß ein Extrakt von 250 g des Untersuchungsgutes so aufgearbeitet und gereinigt werden, daß 1 ml der Testflüssigkeit eine 0,5 g Untersuchungsgut entsprechende Extraktmenge aufnehmen kann, um die Wirkstoffkonzentration von 5×10^{-7} g/ml zu erreichen, die im Durchschnitt bei allen chlorierten Kohlenwasserstoffen innerhalb 24 Stunden wirksam ist. Bei den Phosphorverbindungen und Carbamaten sind die Größenordnungen um durchschnittlich 1,5 Zehnerpotenzen günstiger.

Kriterien zur Auswertung der Schädigung.

Das sicherste Kriterium, die vollkommene Schädigung eines Testtieres festzulegen, ist sein Tod. Bei höheren Testtieren läßt sich diese Feststellung ohne Schwierigkeiten bewerkstelligen, bei Daphnien dagegen ist sie weniger einfach. Der Tod kann bei ihnen nur durch genaue Beobachtung der Extremitäten und der inneren Organe, die durch die Schale durchscheinen, mit Sicherheit festgestellt werden. Bewegungsunfähigkeit und Rückenlage brauchen nicht unbedingt dem Eintritt des Todes gleichgesetzt zu werden.

Demgegenüber konnte aber festgestellt werden, daß der Vergiftungsablauf, wenn er einmal eingetreten war, mit vollständiger Sicherheit zum Tode führte. Für diesen Befund war es unbedeutend, ob die Daphnien nach Eintritt der ersten Exzitationsphasen in dem wirkstoffhaltigen Ansatz belassen oder ob sie in einen wirkstofffreien überführt wurden. Diese Irreversibilität wurde auch von S e u m e (141) beobachtet.

Es lag daher nahe, den Versuch zu unternehmen, einige Stadien des Vergiftungsablaufs näher auf ihre Eignung für ein Kriterium zu überprüfen, das eine Bewertung zuläßt. Für eingehende Untersuchungen kamen der Übergang von Latenzphase zu erster Exzitationsphase und die Phasen der engen dreidimensionalen und zweidimensionalen Bewegungen in Betracht.

Der Lichtreiz.

Der Anlaß, die Latenzphase mit Hilfe eines Lichtreizes auf ihre Eignung für ein Kriterium zu untersuchen, ergab sich aus den Angaben von B u r c h f i e l d (19) und N o l a n (118). Sie hatten in der Latenzphase bei Aedeslarven eine Änderung der Empfänglichkeit festgestellt und diesen Befund quantitativ ausgewertet.

In einer ähnlichen Versuchsanordnung wurden aus der Zucht gewonnene, einen Tag alte Daphnien dahingehend untersucht. Die Daphnien waren nach dem ersten Absieben mit verschiedenen groben Schwebestoffen behaftet, die zu entfernen sich als zweckmäßig erwies. Dies geschah am besten dadurch, daß die jungen Daphnien in ein großes Volumen Wohnwasser überführt wurden. Nachdem sich die Schwebestoffe abgesetzt hatten, konnten die Daphnien dekantiert, auf dem Sieb gesammelt und in klares Wohnwasser gebracht werden. Aus dem Vorratsgefäß wurden die Daphnien mit einer 1 ml-Stabpipette, der ein Stück der Spitze abgenommen worden war, in die Testgefäße gebracht. Dies geht sehr schnell und fehlerfrei, wenn sich im Vorratsgefäß etwa 5 bis 10 Daphnien pro Milliliter befinden, davon 3 bis 6 aufgezogen und bei waagrecht gehaltener Pipette gegen einen dunklen Hintergrund gezählt werden.

Nachdem in einem kleinen Becnerglas der Wirkstoffzusatz erfolgt war, wurden die Daphnien in ein Glasrohr von 8 mm x 1000 mm gebracht, das sich an beiden Enden mit einer Glasplatte verschließen ließ. Die Versuche wurden in einem verdunkelten Raum bei Rotlicht durchgeführt. In Abständen von 5 Minuten wurde die Lichtquelle eingeschaltet und die Reaktionen der Daphnien beobachtet. Während der Latenzphase reagierten sie wie ungeschädigte Daphnien. Sie sammelten sich in einem bestimmten Rohrschnitt, d.h. daß die Daphnien, die sich beim Einschalten des Lichtes zwischen Lichtquelle und Sammelort befunden hatten, den Lichtreiz mit Flucht beantworteten, und daß die Daphnien, die sich jenseits des Sammelortes befunden hatten, dem Lichtreiz positiv folgten. Unterschiedliche Reaktionen wurden in den akuten Phasen beobachtet. Auch die geschädigten nahmen die Rei-

ze sofort auf und setzten sie in intensivere Streckenbewegungen um. Erst in den letzten Stadien der akuten Phase reagierten die Daphnien ohne Fluchtbewegung.

E r g e b n i s s :

Das Ausbleiben von Fluchtbewegungen in der Latenzphase scheint auf Aedeslarven beschränkt zu sein. Bei Daphnien kann in der Latenzphase mit Hilfe eines Lichtreizes kein Anhaltspunkt gewonnen werden, der sich zur Festlegung eines Beobachtungsmodus verwerten ließe, da die Daphnien in der Latenzphase wie ungeschädigte Daphnien reagieren. Erst in den letzten akuten Phasen reagieren sie nicht mehr mit Fluchtbewegungen, sondern verstärken die Bewegungsart, in der sie sich gerade befinden.

Der mechanische Reiz.

Bei den vorausgegangenen orientierenden Untersuchungen wurde beobachtet, daß Daphnien, die bewegungsunfähig waren, bei der geringsten Bewegung, die in der Testflüssigkeit entstand, wieder zu schwimmen anfangen. Die Daphnien, die sich noch bewegten, reagierten auf solche schwache Reize nicht. Wurde die Testflüssigkeit durch schnelles Umrühren oder Umwirbeln in rotierende Bewegung versetzt, sanken die stark geschädigten Daphnien entweder bewegungslos oder mit Kreiselbewegungen zur Mitte des Gefäßbodens, während die noch schwimmfähigen Daphnien gegen die Strömung zu schwimmen versuchten und dabei zur Gefäßwandung abgetrieben wurden. Sie gelangten dabei entweder ganz außen auf den Gefäßboden oder schwammen nach Stillstand des Wassers weiter. Es hatten sich immerhin zwei Gruppen der auf den Gefäßboden zurückgelangten Daphnien gebildet, eine innere, die gleich zu Boden gesunken war, und eine äußere, die erst nach dem Stillstand des Wassers dorthin gelangt war. Mit zunehmender Zeit wurde die innere Gruppe zahlreicher. Da ein erheblicher Teil der inneren Gruppe noch zweidimensional beweglich war, verwischten sich die Grenzen sehr schnell, noch ehe das Wasser gänzlich zur Ruhe gekommen war. Bei 20 Daphnien in einem Testglas war eine Beobachtung unmöglich. Es wur-

de daraufhin versucht, die ein- und zweidimensional beweglichen Daphnien durch seitliche Betrachtung der Testgläser auszublenken und nur die schwimmfähigen Daphnien zu beobachten. Dies konnte am besten in weiten Reagensgläsern geschehen, die unten schwarz lackiert waren. Dadurch wurde ein weit auseinandergezogenes Beobachtungsfeld erhalten, aber 20 Daphnien konnten nicht gleichzeitig beobachtet werden. Wurden nur 10 Daphnien in ein Testglas gebracht, konnte besser beobachtet werden.

Die Verwendung von Reagensgläsern als Testgläser bewährte sich indessen nicht, weil beim Schütteln immer einige Daphnien an der Gefäßwand hängen blieben und sich der Beobachtung entzogen. Der Versuch hatte aber gezeigt, daß der Test ebenso gut in kleinen Volumina durchgeführt werden kann wie in größeren. Die unhandlichen Bechergläser wurden durch Testgefäße von 30 mm x 90 mm ersetzt, von denen je 5 in einem Trägergestell mit durchsichtigem PVC-Boden Platz fanden. Ein Testansatz bestand aus 5 x 10 Daphnien in 5 x 10 ml Testflüssigkeit. Die Beobachtung erfolgte von oben gegen einen beleuchteten Untergrund. Bei der Auszählung traten die oben genannten Schwierigkeiten wieder auf. Eine bessere Unterscheidung und Abgrenzung der stark geschädigten Daphnien von den weniger stark geschädigten wurde dadurch erreicht, daß der Gefäßboden nach oben etwa 1 cm hoch kegelförmig ausgezogen wurde. Nach kräftigem Umschwenken sammelten sich die ein- und zweidimensional beweglichen Daphnien in unmittelbarer Nähe der Kegelspitze und glitten langsam auf der schiefen Ebene zum unteren Teil des Gefäßbodens hinab. Diejenigen Daphnien, die während des Hinabgleitens keine nach oben oder seitwärts gerichtete Bewegung ausführten, konnten gut erfaßt und ausgezählt werden.

E r g e b n i s :

Stark geschädigte Daphnien, die nur noch ein- oder zweidimensionale Bewegungen ausführen können, werden einem starken mechanischen Reiz ausgesetzt. Ihr weiteres Verhalten kann am besten beobachtet und beurteilt werden, wenn sie langsam zur

tiefsten Stelle des Gefäßbodens hinabgleiten können. Dies wird durch kegelförmige Ausbildung des Gefäßbodens erreicht. Dieses Verfahren verspricht, bei quantitativen Untersuchungen angewendet werden zu können.

Reinigung der Testgefäße.

H u e s m a n n (75) gibt in einer Übersicht 10 verschiedene Reinigungsverfahren für Testgefäße an, die von verschiedenen Autoren angegeben wurden, und berichtet über Erfahrungen, die er damit gewonnen hatte. Die Verfahren sind recht umfangreich und zum Teil sehr robust. Die Testgefäße werden durch verschiedene Reinigungsbäder gezogen, mit Bürste und Spülmittel bearbeitet, mit Lösungsmitteln nachgespült, getrocknet und ausgeflammt.

Bei den Testgefäßen des Daphnientestes erwies sich ein derartiges Vorgehen als nicht notwendig. Es genügte, wenn die Testgefäße sofort nach dem Test 2 bis 3 mal mit heißem Wasser vorgespült, mit Bürste und Spülmittel kräftig bearbeitet und schließlich von anhaftenden Spülmittelresten befreit wurden. Zur Sicherheit wurden sie einmal pro Woche nacheinander mit Aceton und Methylenchlorid ausgespült. Der Nachweis für die ausreichende Entfernung der Wirkstoffe wurde dadurch erbracht, daß Daphnien in derart gereinigten Testgefäßen unbegrenzt lange gehalten und weitergezüchtet werden konnten.

Die Reinigung scheint wohl deshalb so einfach vonstatten zu gehen, weil im Daphnientest die Wirkstoffe im Testmedium entweder gelöst oder fein suspendiert sind und deshalb nicht so leicht von der Gefäßwand adsorbiert werden können wie im Drosophilatest, wo die Wirkstoffe feste Beläge bilden.

Quantitative Untersuchungen.

Nachdem durch die orientierenden Untersuchungen die Empfindlichkeit von Daphnien nachgewiesen und abgegrenzt war, konnten quantitative Untersuchungen durchgeführt werden. Die Voraussetzungen schienen durch die Möglichkeit, daß genügend Tiermaterial durch Zucht gewonnen werden konnte, und durch die Ausgestaltung der Testgefäße gesichert.

Während der vorausgegangenen Beobachtungen an Daphnien bestätigten sich die Angaben von P f a f f (130), wonach Daphnien, die unter verschiedenen Umwelts- und Zuchtbedingungen aufgewachsen waren, unterschiedlich empfindlich reagierten. Nach eigenen Beobachtungen schienen 5 bis 10 Tage alte Daphnien am empfindlichsten zu sein.

Soweit Daphnien erhalten werden konnten, die unterschiedliche Empfindlichkeit erwarten ließen, wurden sie zu diesen Untersuchungen verwendet. Dies waren 5 bis 10 Tage alte männliche Zuchtdaphnien (σ^7 D), einen Tag alte Zuchtdaphnien (ZD), 2 Tage alte Zuchtdaphnien, die kein Futter erhalten hatten (Hungerdaphnien = HD) und einen Tag alte Freilanddaphnien (FD). Die Freilanddaphnien konnten nicht aus ihrer natürlichen Umgebung gewonnen werden. Darunter sind vielmehr solche jungen Daphnien zu verstehen, die von kräftigen weiblichen Daphnien innerhalb der ersten beiden Tage der Gefangenschaft hervorgebracht wurden.

Die Versuche wurden bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, um gleichzeitig Aufschluß über die Empfindlichkeit der Daphnien in Abhängigkeit von der Versuchstemperatur zu erhalten. Ein Testansatz bestand aus 5 x 10 Daphnien in 5 x 10 ml Testflüssigkeit. Die Wirkstoffe wurden aus wässrigen Stammlösungen zugesetzt. Die wässrigen Lösungen wurden in der Weise täglich frisch hergestellt, indem 1 ml einer alkoholischen Stammlösung, die 10^{-3} g/ml Wirkstoff enthielt, in 10 ml einer 1 %igen Tween-80-Lösung pipettiert und auf 100 ml ergänzt wurde (Konzentration: 10^{-5} g/ml). Die nächst niederen

Konzentrationsstufen wurden durch weiteres Verdünnen mit destilliertem Wasser erhalten. Beim Wirkstoffzusatz wurde die Verdünnungsstufe gewählt, die in 0,2 ml bis 1 ml die gewünschte Wirkstoffmenge enthielt. Beim Ansatz eines Testes (5 x 10 Daphnien) wurden zuerst die Daphnien zusammen mit 1 ml Wohnwasser in die Testgefäße gezählt, dann wurden weitere 4 ml Wohnwasser und die Wirkstofflösung zugesetzt. Die Ergänzung auf 10 ml erfolgte ebenfalls mit Wohnwasser. Die Auszählung erfolgte auf die beschriebene Weise. Die Testgefäße bzw. ihr Inhalt wurden vorsichtig, aber kräftig umgeschwenkt. Die Auszählung erfolgte zuerst von links nach rechts und wurde von rechts nach links wiederholt; bei abweichenden Ergebnissen wurden in den betreffenden Gläsern ein drittes Mal ausgezählt. Die Anzahl der Geschädigten wurde sofort notiert. Die Auswertung der Ergebnisse wurde nach M o s e b a c h (115,116) vorgenommen. Die graphische Darstellung erfolgte auf einfach-logarithmischem Papier, wobei auf der linearen Einteilung für eine Probit-einheit 50 mm gewählt wurden, um den Bereich zwischen 10 % und 90% Mortalität möglichst weit auseinanderziehen zu können. Durch die Punkte wurde nach Augenmaß ein Gerade gelegt, wobei besonders darauf geachtet wurde, daß die Abstände der Punkte von der Geraden, soweit sie nicht durch die Punkte hindurch ging, im Bereich zwischen 20 % und 80 % Mortalität möglichst gleich groß waren. Wird im Schnittpunkt der Geraden mit der Probit-5-Linie = 50 % - Linie auf die logarithmische Zeitachse das Lot gefällt, erhält man den graphischen LT_{50} -Wert.

E r g e b n i s s e :

Die Wirksamkeit eines Wirkstoffes hängt bei gleicher Versuchstemperatur von den Bedingungen ab, unter denen die Testtiere aufgewachsen sind. Bei gleicher Konzentration wird eine parallele Kurvenschar erhalten, zu denen die bei anderen Konzentrationen und Versuchstemperaturen erhaltenen Geraden weitgehend parallel verlaufen. Die Abb. 4 zeigt die Ergebnisse für Gusa-thion. Die Ergebnisse für die übrigen Phosphorverbindungen und Carbamate sind im Anhang, Abb. 13 - 18, dargestellt.

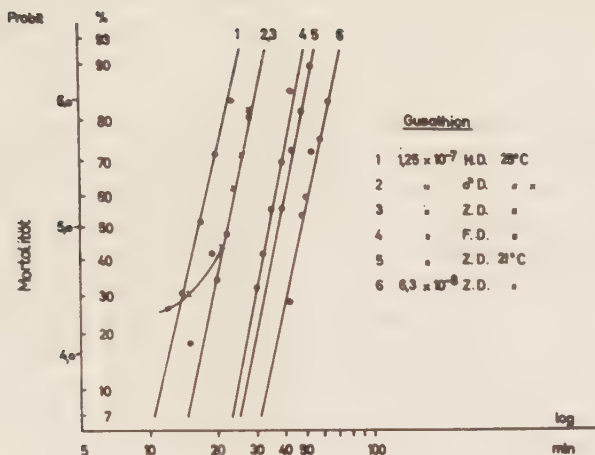


Abb. 4 Wirkung von Gusathion bei unterschiedlichen Testbedingungen.

Die Unterschiede der LT_{50} -Werte sind bis auf Kurve 2/3 deutlich zu erkennen. Sie betragen bei diesem Versuch für

- | | |
|------------------------|----------------|
| 1.) Hungerdaphnien | 16,5 Minuten, |
| 2.) männliche Daphnien | 22 Minuten, |
| 3.) Zuchtdaphnien | 22 Minuten, |
| 4.) Freilanddaphnien | 34 Minuten, |
| 5.) Zuchtdaphnien | 38 Minuten und |
| 6.) Zuchtdaphnien | 50 Minuten |

(Angaben über Temperatur und Konzentration in der Abbildung.)

Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit den übrigen Verbindungen erzielt. Die Reihenfolge zunehmender Empfindlichkeit verläuft über Freilanddaphnien, männliche Daphnien, Zuchtdaphnien und Hungerdaphnien. Daß die Hungerdaphnien weitaus empfindlicher sein würden, war nach S e u m e (131) zu erwarten, da Daphnien beim Fehlen von Nahrungsstoffen sehr schnell ihre Reserven aufbrauchen und damit gegen sämtliche Einflüsse anfälliger werden.

Ihre Handhabung ist aus diesem Grunde sehr schwierig. Da in keinem Fall vorausszusehen ist, wieviele Daphnien den Hungertag überleben werden, und der Grad der Aushungerung nicht standardisiert werden kann, ist ihre Anwendung für laufende Untersuchungen nicht zu empfehlen.

Die männlichen Daphnien sind nicht so empfindlich, wie erwartet wurde. Der nicht-lineare Verlauf der Kurve besagt, daß die Empfindlichkeit zu wenigstens 40 % nicht normal verteilt ist. Die männlichen Daphnien erleiden bei diesen Wirkstoffkonzentrationen einen stark ausgeprägten K.o.-Schock, der sich innerhalb der ersten 5 Minuten nach dem Zusatz des Wirkstoffes zeigt. Dabei liegen bis zu 50 % bewegungslos am Boden und sprechen auf keinen Reiz mehr an. Danach erholen sich fast alle wieder. P f a f f hatte bei der vergleichenden Untersuchung von Freilanddaphnien ein anderes Ergebnis erhalten. Er beschreibt die Freilanddaphnien als empfindlicher.

Die chlorierten Kohlenwasserstoffe wurden in die vergleichenden Untersuchungen nicht einbezogen, da sie im Bereich zwischen 10^{-6} g/ml und 10^{-7} g/ml zu wenig wirksam waren. Derselbe Befund gilt für Metasystox und Dimethoat, das gegen Daphnien noch weniger wirksam ist als Aldrin. In Abb. 5 sind die LT_{50} -Geraden einiger chlorierter Kohlenwasserstoffe und des Metasystox angeführt. Sie bestätigen im wesentlichen die Befunde der orientierenden Untersuchungen (s.Seite 46).

LT_{50} -Werte von 5×10^{-7} g/ml:

Aldrin	4200 Minuten	Kelthan	3000 Minuten
Alodan	2150 "	Metasystox	710 "
Dieldrin	1800 "	Thiodan	2400 "
γ - HCH	1150 "		

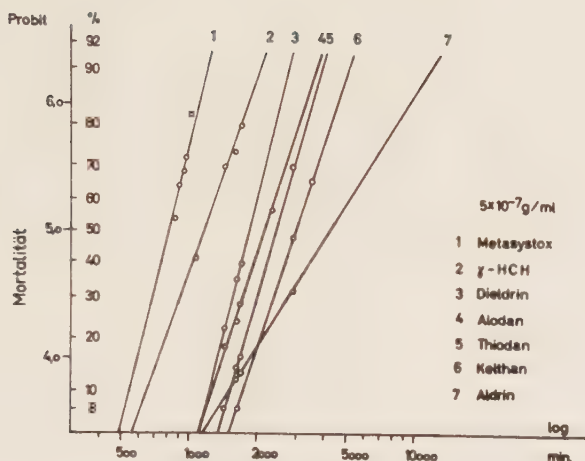


Abb. 5 LT₅₀-Kurven einiger chlorierter Kohlenwasserstoffe und des Metasystox.

Aufstellung von Standardkurven.

Bei der Aufstellung der Standardkurven wurde wiederum nach den Angaben von M o s e b a c h (115,116) verfahren. Die Wirkstoffe wurden in geometrischer Progression dem Testmedium zugesetzt. Die Auswahl der Konzentrationsstufen erfolgte so, daß bei 5 bis 6 Konzentrationen nach etwa 6 Stunden das Ende des Versuches zu erwarten war. Der Konzentrationsbereich lag zwischen 2×10^{-9} g/ml und 10^{-6} g/ml. (2×10^{-9} , 4×10^{-9} , 8×10^{-9} , $1,6 \times 10^{-8}$, $3,2 \times 10^{-8}$, $6,3 \times 10^{-8}$, $1,25 \times 10^{-7}$, $2,5 \times 10^{-7}$, 5×10^{-7} , 10^{-6}). Es war notwendig, die Versuche jeweils an einem Tag durchzuführen, da am folgenden Tag die LT₅₀-Kurven mitunter parallel verschoben waren.

Um dies zu erreichen, war die Einteilung der Arbeit am zweckmäßigsten, wenn zu Beginn des Arbeitstages zuerst die jungen Daphnien aus der Zucht abgesiebt und in ein großes Becherglas übergeführt wurden. Während sich dort die groben Schwebestoffe

am Gefäßboden ansammeln, konnte aus der alkoholischen Stammlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt werden (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} g/ml). Dann wurden die Daphnien vorsichtig auf ein feines Sieb dekantiert und in einen Meßzylinder oder ein Gefäß von ähnlicher Form gebracht. Betrug dort die Dichte der Daphnien 5 bis 10 pro Milliliter, konnten sie, wie beschrieben, mühelos entnommen werden. Zuerst wurden die drei niederen Konzentrationen, dann die hohen Konzentrationen angesetzt. Wurde so verfahren, konnten während der Latenzphasen der niederen Konzentrationen die Letalwerte der hohen Konzentrationen ermittelt werden. Die nächst niedere Konzentration begann meist in der zweiten Hälfte oder nach Ende des Vergiftungsablaufs der nächst höheren Konzentration wirksam zu werden. Damit konnte erreicht werden, daß bei den hohen Konzentrationen höchstens zwei, bei den niederen Konzentrationen höchstens drei Ansätze gleichzeitig ausgezählt werden mußten. Während des Testes wurde versucht, die Raumtemperatur im Bereich zwischen 19°C und 22°C zu halten. Gelingt dies nicht, wurden die Ansätze bis zum Eintritt der Wirkung in ein Wasserbecken gestellt.

E r g e b n i s :

Fünf bis sieben Ansätze reichen aus, um eine Standardkurve zu erhalten. Der Verlauf der Kurve kann auch für die Konzentrationsstufe, die unter der niedrigsten liegt und nicht getestet wurde, als verbindlich angenommen werden, d.h. daß eine Kurve, die in 8×10^{-9} g/ml endet, auch noch für 4×10^{-9} g/ml zu gelten hat. Die Abb. 6 umgrenzt den Bereich, innerhalb dessen alle Phosphorverbindungen mit Ausnahme des stärker wirksamen DDVP und der weitaus schwächer wirksamen Metasystox und Dimethoat liegen. Er umfaßt zwei Zehnerpotenzen, aber die am häufigsten angewandten Verbindungen Parathion, Gusathion, Diazinon und Phosdrin sind etwa in derselben Größenordnung wirksam (s.a. Abb. 19, Anh.). Durch Erhöhung der Testtemperatur verschieben sich die Standardkurven nach links. Die Steigerung der Wirksamkeit gilt für alle untersuchten Verbindungen (s.a. Abb. 13, 14, 15, Anh.).

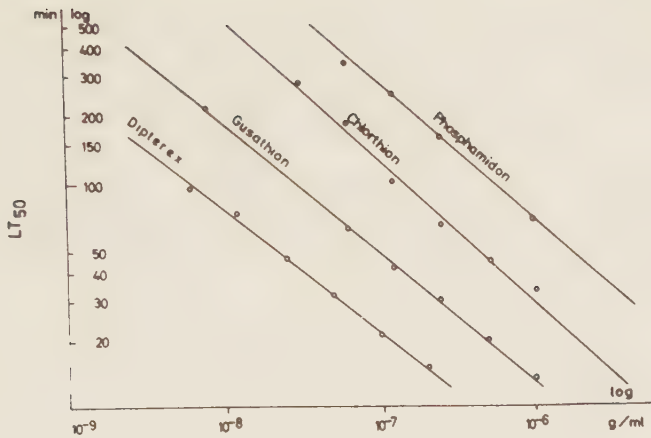


Abb. 6 Standardkurven, aufgenommen bei 19°C bis 22°C.

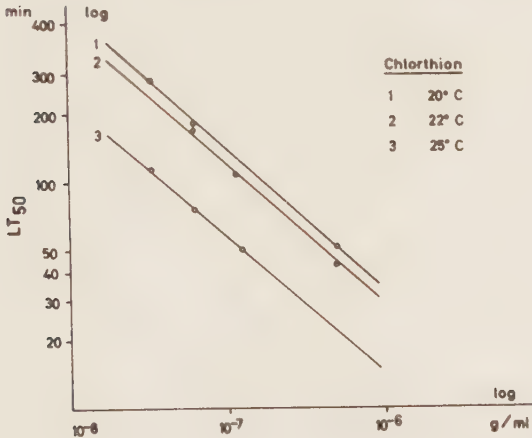


Abb. 7 Standardkurven von Chlorthion bei verschiedenen Temperaturen.

Schwellenwerte.

Der Schwellenwert eines Wirkstoffes sei als die Konzentrationsstufe definiert, die in einer Reihe mit geometrischer Progression unter derjenigen Konzentration liegt, die innerhalb 24 Stunden noch auf wenigstens einen Teil der Testtiere letal wirkt.

Zur Ermittlung der Schwellenwerte wurden die Daphnien den Wirkstoffen im Bereich zwischen 10^{-10} g/ml und $3,2 \times 10^{-9}$ g/ml ausgesetzt. Die Versuche wurden mit 2×10 Daphnien für jede Konzentrationsstufe durchgeführt.

E r g e b n i s s :

Tab. 4 Schwellenwerte.

Wirkstoff	g/ml	Wirkstoff	g/ml
Chlorthion	$> 3,2 \times 10^{-9}$	Malathion	2×10^{-9}
Delnav	10^{-10}	Mercaptophos	2×10^{-10}
Diazinon	4×10^{-10}	Metasystox	$> 10^{-8}$
DDVP	4×10^{-10}	Parathion	2×10^{-10}
Dimethoat	$> 10^{-6}$	Phosdrin	2×10^{-10}
Ethion	2×10^{-10}	Phosphamidon	$> 5 \times 10^{-9}$
Gusathion	2×10^{-10}	Sevin	$> 5 \times 10^{-9}$
Isolan	8×10^{-10}	Dipterex	10^{-10}

Auffallend ist, daß DDVP, Isolan und Sevin, die im Bereich 10^{-7} g/ml alle anderen Verbindungen an Wirksamkeit übertreffen, im Bereich niedrigster Konzentrationen weniger wirksam sind. Das Umgekehrte gilt für Mercaptophos (Lebaycid), das in hohen Konzentrationsbereichen mit Chlorthion verglichen werden kann.

Oxydation von Thioverbindungen nach C o o k.

Biologische Verfahren, die auf einer in-vitro-Aktivierung eines Insektizides beruhen, sind bislang nicht bekannt geworden, obwohl S c h r a d e r (139) schon lange auf die starke Wirkung des Paraoxon hingewiesen hatte, das das Parathion um ein Vielfaches an insektizider Wirkung übertrifft, und obwohl es C o o k (31,32,33,34) und R o s e n t h a l (137) gelungen war, einige Thioverbindungen mit Brom oder Bromsuccinimid zu oxydieren und somit einer Bestimmung der in-vitro-Cholinesterasehemmung zugänglich zu machen.

Es wurde daher der Versuch unternommen, die Änderung der Wirksamkeit von Thio- und Dithioestern, die zuvor mit Brom behandelt worden waren, im Daphnientest zu ermitteln. Um Störungen durch überschüssiges Brom auszuschließen, wurden die Daphnien in bromhaltige Testflüssigkeit mit Bromgehalten zwischen 10^{-7} und 10^{-4} g/ml gebracht. Die bromhaltige Testflüssigkeit wurde durch Verdünnen von gesättigtem Bromwasser hergestellt, das nach Holleman-Wiberg einen Bromgehalt von 3,55 % hat. Es zeigte sich, daß Bromgehalte von 5×10^{-6} g/ml und weniger schadlos vertragen wurden. Anders verhielten sich Tweenlösungen, die im Überschuß mit Brom versetzt worden waren; sie schädigten die Daphnien stark. Die Anwendung von Tween als Lösungsmittler erwies sich in der Folge als nicht notwendig, da die Verbindungen, die Brom verbraucht hatten, in Wasser löslicher waren als die unbehandelten Verbindungen.

1 ml der alkoholischen Stammlösung eines Thioesters wurde tropfenweise mit 1 : 100 verdünntem Bromwasser solange versetzt, bis die schwache Gelbfärbung, die durch Farbvergleich mit 0,1 ml des verdünnten Bromwassers in 1 ml Alkohol ermittelt wurde, etwa 5 Minuten lang bestehen blieb. Chlorthion, Delnav, Diazinon, Ethion, Gusathion, Mercaptophos und Parathion verbrauchten das zugesetzte Brom spontan; bei Diazinon fiel ein weißer Niederschlag aus. Bei Dimethoat, Malathion und Metasystox blieb die Bromfarbe erhalten; ebenso widerstanden die Vinylester Phosphamidon und Phosdrin der Bromeinwirkung.

Bei den Verbindungen, die Brom verbraucht hatten, wurde die Änderung der Wirksamkeit ermittelt. Parathion, Ethion, Gusathion und Chlorthion wirkten in der Konzentration 10^{-6} g/ml fast momentan; Diazinon dagegen hatte nach Stunden noch keine Wirkung. Bei Delnav und Mercaptophos konnten keine sicheren Anhaltspunkte für eine Wirkungsänderung erhalten werden.

Ergebnisse:

Die Gegenüberstellung der Standardkurven des brombehandelten und des unbehandelten Gusathions läßt eine deutliche Steigerung der Wirksamkeit erkennen.

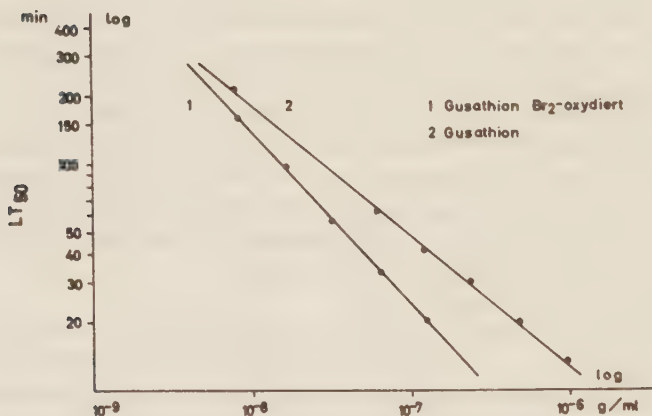


Abb. 8 Standardkurven von Gusathion.

Die Steigerung der Standardkurven der Verbindungen, die durch Bromeinwirkung stärker wirksam geworden sind, ist deutlich größer als die der unbehandelten Verbindungen (s.a. Abb. 18, Anh.). Sie sind mit der Steigung der Standardkurve von Phosdrin vergleichbar, das als Sauerstoffverbindung der Gruppe der

autotoxischen Phosphorverbindungen angehört.

Dimethoat, Malathion und Metasystox lassen sich auch mit stärkeren Oxydationsmitteln nicht aktivieren. Dies widerspricht zum Teil den Angaben von C o o k, der auch über die Steigerung der Wirksamkeit von Diazinon berichtet.

Nach den vorliegenden Ergebnissen können die organischen Phosphorverbindungen in drei Gruppen eingeteilt werden, die durch Behandlung mit Brom

- 1.) ihre Wirkung weitgehend einbüßen (Diazinon),
- 2.) keine Änderung ihrer Wirkung erkennen lassen
(alle systemischen, Malathion),
- 3.) stärker wirksam werden (Chlorthion, Ethion, Gusa-
thion, Parathion).

Auffallenderweise sind die Schwellenwerte der dritten Gruppe von den Schwellenwerten ihrer ursprünglichen Verbindungen wenig verschieden. Dem Schwellenwert kann aber wegen der zu geringen Genauigkeit, die zu seiner Feststellung führten, keine zu große Bedeutung beigemessen werden.

B. Ermittlung von Rückständen.

Von allen Untersuchungsgütern, in denen Rückstände auftreten können, sind frisches Obst und Gemüse die am leichtesten verderblichen. Diese Eigenschaft bedingt, daß danach getrachtet wird, die Zeitspanne zwischen Ernte und Verzehr möglichst kurz zu halten. Die amtliche Lebensmittelüberwachung muß daher imstande sein, bei der Ermittlung von Rückständen so vorgehen zu können, daß beim Bedarf Untersuchungsergebnisse vorliegen, ehe diese Güter in die Hand des Verbrauchers gelangt sind. Als kritische Werte haben dabei die Toleranzwerte zu gelten, die von der "Kommission für Pflanzenschutzmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft" vorgeschlagen worden sind. Sie entsprechen etwa den Toleranzwerten, die in der Toleranzenliste der Food and Drug Administration, Washington, für die USA als gesetzlich verbindlich angegeben sind. Sie betragen bei Phosphorverbindungen 0,5 ppm bis 2 ppm und bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen 1 ppm bis 10 ppm. Aldrin und ähnliche Verbindungen sind hiervon ausgenommen. Sie dürfen als Rückstände entweder überhaupt nicht oder nur bis höchstens 0,1 ppm auftreten.

Nach den Ergebnissen, die von den orientierenden Untersuchungen über die Empfindlichkeit von Daphnien vorlagen, schienen Daphnien für die Aufgaben, vor die die amtliche Lebensmittelüberwachung gestellt ist, geeignet zu sein, auch wenn die Charakterisierung einzelner Verbindungen mit ihrer Hilfe nicht möglich ist. Ihre Empfindlichkeit gegenüber organischen Phosphorverbindungen und Carbamaten läßt die Erwartung zu, daß Rückstände, die erheblich unter der Toleranzgrenze liegen, schnell erkannt werden können, wenn man von einer Versuchsanordnung ausgeht, bei der 10 ml Testflüssigkeit 1 g Untersuchungsgut entsprechen.

Nach den Angaben von W o l l e r m a n (163) und D o w l y (41) schienen Direktverfahren für diese Problemstellung geeignet zu sein.

Direktverfahren.

Als Direktverfahren sind solche Verfahren zu bezeichnen, die es gestatten, den Testorganismus auf das wirkstoffhaltige Material zu bringen. Die Definition kann dahingehend eine Erweiterung erfahren, indem man als Direktverfahren auch solche bezeichnet, bei denen das Untersuchungsgut einer geringfügigen und zeitlich und materiell wenig aufwendigen Bearbeitung unterworfen wird, so daß der Testorganismus mit dessen wesentlichen Inhaltsbestandteilen in Berührung kommt. - Daß Inhaltsstoffe des Untersuchungsgutes in den Testansatz gelangen, ist nicht ursprüngliche Absicht, sondern Folge der wenig aufwendigen Bearbeitung. - Nach S u n und P a n k a s k i (151) können durch Inhaltsbestandteile des Untersuchungsgutes Änderungen in der Empfindlichkeit der Testorganismen hervorgerufen werden: Lipotide verzögern den Wirkungseintritt, ätherische Öle können selbst wirksam sein.

Abwaschverfahren.

Die Untersuchungen über die Wirksamkeit aller überprüften Insektizide haben gezeigt, daß ihre Wirkung weitgehend von der Konzentration abhängt. Demnach konnte gefolgert werden, daß diese meist schwerlöslichen Verbindungen in Bereichen von 10^{-6} g/ml abwärts in der wässrigen Phase stabil verteilbar sind. Wurden die alkoholischen Stammlösungen mit Wasser weiterverdünnt, waren die Verdünnungsstufen zwischen 10^{-4} g/ml und 10^{-5} g/ml schwach opalisierend getrübt. 10^{-5} g/ml Phosphorverbindung ergab jedoch gegenüber den chlorierten Kohlenwasserstoffen eine nur sehr schwer erkennbare Opaleszenz. Wurden die Stammlösungen in 10 ml einer 1 %igen Tween-80-Lösung pipettiert, traten keine Trübungen mehr auf. Die Gemische blieben auch nach dem Verdünnen mit Wasser klar.

Um die Abwaschbarkeit der Insektizide zu überprüfen, wurden die Modellversuche zunächst an anorganischem Material durchgeführt. Die Wirkstoffe wurden in Methylenchlorid gelöst (10^{-3} g/ml). Je 1 ml wurde in einen 25-ml-Erlenmeyerkolben gebracht. Das Lösungsmittel wurde so entfernt, daß ein weitgehend gleichmäßiger Belag des Wirkstoffes auf dem Gefäßboden entstand. Nachdem

Reste des Lösungsmittels im Vakuum entfernt worden waren, wurde 1 ml einer 0,5 %igen Tweenlösung zugesetzt und kräftig, aber unter Vermeidung einer allzu starken Schaumbildung 3 bis 4 mal je eine Minute lang umgeschwenkt. Der Vorgang wurde 2 mal mit je 2 ml einer 0,1 %igen Tweenlösung wiederholt. Danach wurde mit Testflüssigkeit nach Boyd (s.S.31) solange geschüttelt und nachgespült, bis keine Schaumbildung mehr auftrat. Die Abwaschwirkung wurde dadurch überprüft, daß die trockene Gefäßwand mit etwa 0,5 ml Aceton benetzt, mit 10 ml Boyd-Flüssigkeit, die 0,01 % Tween enthielt, nachgespült und einige Male kräftig geschüttelt wurde. Das Aceton ließ sich im Vakuum entfernen. In diesen Ansatz wurden 20 weibliche Daphnien zusammen mit weiteren 10 ml Boyd-Flüssigkeit gebracht und nach 24 Stunden beobachtet. Bei den Phosphorverbindungen sprachen die Ergebnisse für eine fast vollständige Entfernung, bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen dagegen wurden noch toxische Mengen festgestellt.

Ergebnisse:

Tab. 5 Rückstandswirkung von 10^{-3} g Wirkstoff in
ausgewaschenen Gläsern.

Wirkstoff	24 Std.	Wirkstoff	24 Std.
Aldrin	+	Chlorthion	-
Alodan	++	Diazinon	+
Chlorbenzilat	-	Gusathion	+
DDT	+++	Malathion	-
Diieldrin	++	Parathion	+
Endrin	+	Phosphamidon	-
γ-HCH	+++	Isolan	-
Thiodan	-	Sevin	-
Toxaphen	-		

Zeichenerklärung: - = keine Wirkung
 + = Exzitationsphasen, keine Toten
 ++ = Letalwirkung unter 90 %
 +++ = Letalwirkung über 90 %

Organische Phosphorverbindungen und Carbamate werden sehr gut von der Glasoberfläche abgewaschen. Es läßt sich abschätzen, daß die schwache Wirkung der Rückstände in den Gläsern, die Diazinon, Gusathion und Parathion enthielten, von weniger als 5×10^{-9} g/ml herrührten (das entspricht weniger als 10^{-7} g Rückstand pro Glas).

Weniger gut werden die chlorierten Kohlenwasserstoffe von der Glasoberfläche abgewaschen. Das Ausbleiben einer Wirkung in den Gläsern, die Aldrin, Chlorbenzilat, Thiodan und Toxaphen enthalten hatten, kann nicht ohne weiteres einer vollständigen Abwaschwirkung gleichgesetzt werden, da die Genannten selbst in hohen Konzentrationen schwach wirksam sind. Trotz des Verbleibens hoher Rückstände kann die Abwaschwirkung einer 1 %igen Tweenlösung nach den Ergebnissen des Testes, der in dem Waschwasser durchgeführt wurde, als befriedigend bezeichnet werden (Tab. 6). Die Waschwässer wurden mit Boyd-Flüssigkeit auf 1000 ml ergänzt (Tweengehalt: 0,012 %, theoretischer Wirkstoffgehalt: 10^{-6} g/ml).

Tab. 6 Wirkung von chlorierten Kohlenwasserstoffen in Waschwässern.

Wirkstoff	5 Std.	20 Std.	24 Std.
Aldrin	+	++	++
Alodan	+	++	+++
Chlorbenzilat	-	+	++
DDT	++	+++	+++
Dieldrin	+	+++	+++
Endrin	+	+++	+++
γ - HCH	++	+++	+++
Thiodan	-	++	++
Toxaphen	-	++	++

Zeichenerklärung: s.Tab. 5 (S. 68)

Abwaschversuche mit Pflanzenmaterial.

Nachdem sich alle überprüften Wirkstoffe mit Wasser, das einen Lösungsvermittler enthielt, von einer glatten Glasoberfläche ablösen ließen, konnte angenommen werden, daß wenigstens ein Teil der Wirkstoffe sich auch von der Oberfläche eines Pflanzenteiles entfernen lassen würde.

Am besten schienen die Aussichten mit solchen Pflanzenteilen, die eine glatte Oberfläche besitzen und bei denen das Verhältnis Oberfläche zu Gewicht (cm^2/g) klein ist, da hier die ppm-Rückstände auf einer verhältnismäßig kleinen Fläche verteilt sind und außerdem gleichmäßig von dem Waschwasser umspült werden können. Die Auswahl des Pflanzenmaterials wurde nach 5 Gesichtspunkten getroffen:

- 1.) Möhren (glatte Oberfläche ohne Wachsbelag, Verhältnis $\text{cm}^2 : \text{g}$ kleiner als 3),
- ...) Gurken (glatte Oberfläche mit geringem Wachsbelag, Verhältnis $\text{cm}^2 : \text{g}$ kleiner als 3),
- 3.) Äpfel (glatte Oberfläche mit starkem Wachsbelag, Verhältnis $\text{cm}^2 : \text{g}$ kleiner als 3),
- 4.) junge Spinatblätter
(glatte Oberfläche mit mittlerem Wachsbelag, Verhältnis $\text{cm}^2 : \text{g}$ größer als 30),
- 5.) Kopfsalat
(gewellte bis krause Oberfläche mit starkem Wachsbelag, Verhältnis $\text{cm}^2 : \text{g}$ größer als 30).

Das Pflanzenmaterial wurde vor dem Auftragen der Wirkstoffe nicht gewaschen. Die Wirkstoffe wurden mit einer Pipette aufgetragen; dabei wurde ihre Konzentration in dem Formulierungsgemisch so gewählt, daß diejenige Menge, die aufgetragen werden sollte, in 1 ml enthalten war. Das Formulierungsgemisch bestand aus 10 Teilen Alkohol und 90 Teilen einer 0,2 %igen Tweenlösung (v/v). Die Formulierungsgemische wurden bei Bedarf frisch hergestellt.

Mit den 5 Untersuchungsgütern wurden Blindversuche durchgeführt, indem sie wie in den Hauptversuchen abgewaschen wurden. Jeweils 500 g Gurken, Möhren und Äpfel und 100 g Kopfsalat und Spinat wurden mit 500 ml Wasser zusammengebracht und mechanisch geschüttelt. In die Waschwässer wurden 20 Daphnien gegeben und nach 24 Stunden beobachtet. Dabei zeigte sich, daß die Waschwässer von Gurken, Möhren und Äpfeln gut vertragen wurden, bei denjenigen von Salat und Spinat die Daphnien aber eingingen. Das Salatwaschwasser konnte durch weiteres Verdünnen verträglich gemacht werden, während das Spinatwaschwasser weiterhin unverträglich blieb. Da die Ursache hierfür nicht geklärt werden konnte, schied Spinat für die weiteren Untersuchungen aus.

Zunächst wurde eine größere Anzahl von Wirkstoffen im Bereich der zu erwartenden Toleranzmengen aufgetragen; mit einigen Wirkstoffen wurden auch Abwaschversuche unterhalb des Toleranzbereiches durchgeführt. Nach dem Auftragen der Wirkstoffe wurde bis zum vollständigen Abtrocknen beiseite gestellt, in Papier und einen Polyäthylenbeutel verpackt und bis zum folgenden Tag bei 8°C aufbewahrt. Für den Waschvorgang wurde das Untersuchungsgut, wenn nötig, in möglichst wenige grobe Stücke zerschnitten, in eine gut verschließbare Pulverflasche von 1 l bis 2 l Inhalt gebracht, mit 0,6 Gewichtsteilen (Salat 3 Gewichtsteile) Boyd-Wasser von 35°C und einem Tweengehalt von 0,01 % übergossen und eine halbe Stunde lang mechanisch geschüttelt. Nachdem sich nach 10 bis 20 Minuten der durch das Schütteln entstandene Schaum zurückgebildet hatte, wurde durch Glaswatte filtriert. Danach wurde zweimal mit 0,2 Gewichtsteilen (Salat 2 x 1) durch Schütteln von Hand nachgespült. Bei Äpfeln, Möhren und Gurken wurden mehr als 95 %, bei Salat ungefähr 90 % des eingesetzten Waschwassers wieder erhalten.

Die Waschwässer wurden mit 5 x 20 Daphnien in 150-ml-Bechergläsern ausgetestet. Nach einer halben Stunde wurde in Abständen von 20 Minuten beobachtet. Dabei war zu erkennen, daß die Sterblichkeit in den Ansätzen mit chlorierten Kohlenwasserstoffen sehr viel später einsetzen würde. In Tab. 7 sind die Ergebnisse

zusammengefaßt, die an Gurken, Möhren und Äpfeln erhalten wurden. Sie konnten zusammen dargestellt werden, weil keine wesentlichen Unterschiede in der Wirkung der Waschwässer festgestellt wurden; das Abwaschen wurde wiederholt.

Nach dem zweiten Abwaschen wurde in einem bei G e i g y entwickelten und von K o c h e r (86) und M ü l l e r (117) beschriebenen Durchflußextraktor mit Petroläther extrahiert. Da die Abmessungen der Apparatur groß sind, konnten die Stücke ohne zerschnitten zu werden eingebracht werden. Wie in allen folgenden Versuchen wurde niedrig siedender Petroläther (Kp. 35°C) verwendet.

Ein 100 g entsprechender Teil des mit Natriumsulfat getrockneten Extraktes wurde in der einfachen Ausführung des bei G u n - t h e r und B l i n n (66) beschriebenen Kouderna-Danish-Konzentrators zusammen mit 5 ml Acetonitril bei 25°C bis 30°C im Vakuum eingengt, bis der Petroläther vollständig entfernt war. Nach dem Ausspülen des Gerätes betrug der Acetonitril-Extrakt ungefähr 10 ml. Er wurde auf 0°C abgekühlt, filtriert und 1 x mit 5 ml und 2 x mit 2 ml Acetonitril-gesättigtem Petroläther ausgeschüttelt. Die Petrolätherphasen wurden verworfen. Darauf wurde das Acetonitril mit 3 x 40 ml einer Mischung von 10 Teilen Methylenchlorid und 90 Teilen Petroläther (v/v) ausgeschüttelt, nachdem es zuvor mit 30 ml Wasser gemischt worden war. Die Acetonitril-Wasser-Phase wurde nun verworfen. Die Petroläther-Methylenchlorid-Phase wurde zur Entfernung des Acetonitrils 2 x mit 10 ml Wasser vorsichtig behandelt und durch Natriumsulfat filtriert. Die Arbeitsgeräte wurden 3 x mit 5 ml Methylenchlorid nachgewaschen. Nach Zugabe von 2 ml Alkohol wurde im Kouderna-Danish-Gerät eingengt. Der so gereinigte Extrakt, der keinen Petroläther und kein Methylenchlorid mehr enthielt, wurde in 1 ml 1 %iger Tweenlösung aufgenommen und mit Boyd-Wasser auf 200 ml weiterverdünnt. Der Test wurde mit 2 x 20 Daphnien in 2 x 100 ml durchgeführt (s.Tab. 8).

Für Abwaschversuche mit Wirkstoffmengen unterhalb der Toleranzgrenze wurden nur Gurken und einige Phosphorverbindungen und Carbamate herangezogen. Es erfolgte ein Abwaschen (Tab. 9).

E r g e b n i s s e :

Tab. 7 Wirkung von künstlich aufgebracht und in
das Waschwasser übergegangenen Insektiziden.

Wirkstoff	aufgetragene Menge (ppm)	Letalwirkung (90 %) (Std.)
Chlorthion	0,75	2
Diazinon	0,75	2
Gusathion	0,75	1
Malathion	8,0	0,5
Parathion	1,0	2
Phosphamidon	5,0	1
Isolan	1,0	1
Sevin	1,0	1
Alodan	5,0	24
DDT	5,0	5
γ - HCH	5,0	16
Toxaphen	5,0	24

Die orientierenden Untersuchungen sollten lediglich die Frage beantworten, ob sich Wirkstoffe, die künstlich auf pflanzliches Material aufgebracht worden waren, nach kurzer Lagerzeit abwaschen lassen und als Modellfall für Untersuchungsgüter dienen können, die kurz vor der Ernte unsachgemäß behandelt worden sind. Es war zu erwarten gewesen, daß das unterschiedliche Material die Wirkstoff verschieden stark festhalten würde. Das war, soweit die annähernde Bestimmungsmethode diese Aussage zuläßt, nicht der Fall. Die Wirkung des zweiten Waschwassers und des Extraktes machen wahrscheinlich, daß die Wirkstoffe keine tieferen Schichten erreicht haben.

Bei den Versuchen an Kopfsalat konnten keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielt werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen verspricht das einfache Abwaschverfahren, an allen Pflanzenmaterialien angewendet werden zu können, deren Oberflächen/Gewichts-Verhältnis klein ist und deren Oberflächen während des Schüttelns nicht verletzt werden. Diese Voraussetzung erfüllen alle Wurzelgemüse, alle Obstarten aus den Gattungen Prunus und Pirus, ferner Tomaten, Gurken, Bohnen und Erbsen, sofern sie normal reif sind. Das Verfahren scheint geeignet, über Rückstände, die im oder über dem Toleranzbereich liegen, sehr schnell Aufschluß geben zu können.

Bei Gurken, Tomaten, Bohnen, eventuell bei Spätkirschen und Frühzwetschgen besteht die Möglichkeit, daß hohe Rückstände zur Erntezeit auftreten; bei den anderen genannten ist die Wahrscheinlichkeit geringer.

Feldversuche.

Je zwei junge Apfelbäume mit einem durchschnittlichen Behang von ungefähr 2 kg pro Baum wurden während der Fruchtreife mit 0,2 % Primin (Isolan) und 0,3 % Pantrin (Sevin) mit einem Handspritzgerät bis zum beginnenden Abtropfen der Spritzbrühe behandelt. Geerntet wurde nach dem Antrocknen der Spritzbrühe (1.Tag), am dritten Tag und am fünften Tag nach der Behandlung. Danach konnte nicht mehr geerntet werden, da die Äpfel abgefallen waren. Bei jeder Ernte wurden je drei Äpfel entsprechender Größe gepflückt.

E r g e b n i s s e :

In den Waschwässern der ersten und zweiten Ernte trat die Wirkung innerhalb von 5 Minuten ein. Sie wurden daher im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Die Waschwässer der dritten Ernte konnten unverdünnt ausgetestet werden. Zwischen 2. und 3. Ernte waren mehrere starke Regenfälle niedergegangen, die möglicherweise den Wirkungsabfall mitverursachten.

Tab. 10 Wirkung der Waschwässer von Äpfeln, die während der Fruchtreife behandelt wurden.

<u>Isolan</u>	1. Ernte	2. Ernte	3. Ernte
Waschwasser	1 : 10	1 : 10	1 : 1
Abtötungs- zeit für 90 %	20 min	100 min	200 min
<u>Sevin</u>			
Waschwasser	1 : 10	1 : 10	1 : 1
Abtötungs- zeit für 90 %	10 min	20 min	50 min

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den Zeitwerten der Modellversuche läßt ohne weiteres den Schluß zu, daß die Rückstände während der ersten beiden Ernten weit über der 1 ppm-Grenze lagen, während der dritten Ernte jedoch in diese Größenordnung gerückt sind.

Dieser Feldversuch ist nicht praxisnah. Durch ihn sollte gezeigt werden, daß sich das Abwaschverfahren auch an feldbehandeltem Pflanzenmaterial durchführen läßt.

Spätkirschen.

Das Untersuchungsgut stammte aus einem Großversuch des Pflanzenschutzamtes Frankfurt im Anbaugebiet Friedberg. Die Kirschen waren termingerecht gegen die Kirschenfruchtfliege behandelt worden. Das Untersuchungsgut wurde bei der Fruchtreife geerntet. Es war nur eine Ernte möglich.

E r g e b n i s s :

Es wurden 10 Proben untersucht. In keinem Fall wurden die Daphnien innerhalb 24 Stunden geschädigt.

Preßsaftverfahren.

Nach den Erfahrungen, die bei den Abwaschverfahren gesammelt wurden, schien es möglich, in wässrigen Pflanzenauszügen nicht nur systemische Verbindungen erfassen zu können. Zuvor mußten die Verträglichkeit der Pflanzensäfte und die Möglichkeit überprüft werden, die Daphnien in gefärbten Säften beobachten zu können. W o l l e r m a n (163) und D o w l y (41) hatten mit Blättern von Bäumen beides erreicht, indem sie verdünnte Säfte verwendeten und die Beobachtung in Petrischalen durchführten.

Herstellung der Preßsäfte.

Das Pflanzenmaterial wurde möglichst bei trockener Witterung geerntet, von anhaftender Erde so gut als möglich befreit, mit einem Messer grob zerkleinert und gut durchmischt. 100 g des grob zerkleinerten Materials wurden im Starmix so fein als möglich zerkleinert und in einer hydraulischen Handpresse ausgepresst. Der Preßkuchen wurde in den Starmix zurückgebracht und mit 120 ml 0,05 %igen Tweenwassers weiter zerkleinert und nochmals abgepresst. Das Volumen der vereinigten Preßsäfte betrug meist zwischen 180 ml und 190 ml und wurde auf 200 ml ergänzt. Der derart hergestellte Preßsaft wurde "Preßsaft (2=1)" bezeichnet (2 ml Preßsaft entsprechen 1 g Frischpflanze). Die Preßsäfte waren in jedem Fall trübe und mit groben Gewebsfragmenten verunreinigt, die sich am besten durch Zentrifugieren abtrennen ließen. Zentrifugiert wurde in einer Zentrifuge mit Zentrifugenbechern von 750 ml Fassungsvermögen bei 3000 U/min. Die Säfte waren danach noch mehr oder weniger opalisierend getrübt. Ihre optischen Eigenschaften schienen auf keinen Fall einen Test in 150 ml Bechergläsern bei einer Schichthöhe von ungefähr 10 cm zuzulassen. Es schien ferner nach den Erfahrungen, die mit Waschwässern von Kopfsalat und Spinat gewonnen worden waren, nicht möglich, den Test in unverdünnten Preßsäften durchführen zu können. Zur Frage der optischen Eigenschaften wurden weibliche Daphnien in ein beliebiges Volumen der Säfte (2=1) und (10=1) gebracht und von oben gegen einen hellen Untergrund beobachtet (Schichthöhe = 5 cm). Die Preßsäfte wurden

danach auf ihre Eignung beurteilt, ob die Daphnien durch die ganze Schicht hindurch auf dem Boden der Gefäße zu erkennen waren. Zur Frage der Verträglichkeit wurden die Daphnien in einige abgestufte Konzentrationen der Preßsäfte gebracht und in Abständen von einer halben Stunde beobachtet; Ansätze, in denen die Daphnien 3 Stunden überlebt hatten, wurden danach stündlich beobachtet.

E r g e b n i s s e :

Preßsäfte lassen erst ab der Verdünnungsstufe $10=1$ einen Daphnientest zu. Ausgenommen sind die Preßsäfte von Radieschen, Gurken, Melonen und Tomaten, die die Daphnien in der Verdünnungsstufe $10=2$ innerhalb von 5 Stunden nicht schädigen, und die Preßsäfte von Sellerieknollen u. -blättern, Spinat, Lauch und Zwiebeln, die in der Verdünnungsstufe $20=1$ nach 1 bis 2 Stunden die Daphnien sehr schnell eingehen lassen. Dasselbe gilt für Obstsäfte, die nicht neutralisiert worden waren. Die Unverträglichkeit von Sellerie, Lauch und Zwiebeln kann ihrem Gehalt an ätherischen Ölen zugeschrieben werden, nachdem S u n ebenfalls über Störungen durch ätherische Öle berichtet hat. Für einen Direkttest kommen deshalb diese Pflanzen nicht infrage.

Sieht man die Verdünnungsstufe $10=1$ aller anderen Preßsäfte als geeignet an, ergibt sich daraus, daß der Test im Durchschnitt nicht länger als 6 bis 8 Stunden durchgeführt werden kann (Tab. 11 und 12). Ein Rückstand von 1 ppm ergibt, sofern er sich quantitativ in den Preßsaft überführen läßt, die Konzentration 10^{-7} g/ml, die bei sämtlichen Phosphorverbindungen - Metasystox und Dimethoat ausgenommen - lange vor dem Ablauf der Zeitspanne, die die Preßsäfte zulassen, wirksam wird.

Nachdem sich gezeigt hatte, daß sich der Daphnientest in konzentrierten Preßsäften nicht durchführen läßt, konnte der Wasserzusatz schon während der Herstellung der Preßsäfte erfolgen. Die Schwierigkeiten, die bei der oben beschriebenen Herstellungsweise auftraten, führten zu einer anderen Aufarbeitung des Pflanzenmaterials, die sich mehr an die Arbeitsvorschrift von D o w - l y anlehnt. Eine Arbeitsvorschrift, die sich als sehr zweck-

Tab. 11 Optische Eignung der Preßsäfte für den
Daphnientest.

Pflanzen- material	Farbe der Preßsäfte (2=1)	Preßsaft (2. = 1)	Preßsaft (10 = 1)
Blumenkohl	hellgelb	-	+
Erdkohlrabi	hellgelb	-	+
Grünkohl	gelbgrün	-	+
Kohlrabi	rötlich	+	+
Rotkohl	rotviolett	-	+
Weißkohl	hellgelb	-	+
Wirsing	gelbgrün	-	+
Radieschen	rosa	+	+
Bohnen	hellgrün	-	+
Möhren	orange	+	+
Sellerie	hellgelb	+	+
Mangold	braun	-	+
Roterübe	rot	-	+
Spinat	braun	-	+
Gurken	hellgelb	-	+
Melonen	hellgelb	-	+
Tomaten	gelb	+	+
Kopfsalat	braun	-	+
Lauch	gelbgrün	-	+
Zwiebeln	hellgelb	-	+
Äpfel	gelb	+	+
Erdbeeren	rot	+	+
Kirschen	dunkelrot	-	+

Zeichenerklärung:

- = Daphnien sind am Gefäßboden nicht erkennbar.
- ± = Daphnien sind höchstens in Konturen erkennbar.
- +
- = Daphnien sind deutlich erkennbar, ihre Bewegungen können gut beobachtet werden.

Tab. 12 Verträglichkeit verschiedener Verdünnungsstufen
der Preßsäfte.

Pflanzenmaterial	20=1 Std.	10=1 Std.	10=2 Sta.	10=3 Std.	10=4 Std.	10=5 Std.
Blumenkohl	10	8	3	1,5	1	0
Erdkohlrabi	10	8	1,5	1	0,5	0
Grünkohl	10	6	3	2	0,5	0
Kohlrabi	8	7	1	0,5	0	0
Rotkohl	8	5	2	0,5	0,5	0
Weißkohl	5	4	1	0,5	0	0
Wirsing	10	6	3	1	0,5	0
Radieschen	10	7	5	2	1	0
Bohnen	10	10	3	2	1	0,5
Möhren	10	8	3	1	0,5	0
Sellerie	4	2	1	0	0	0
Mangold	10	8	1	0	0	0
Roterübe	10	8	2	0,5	0	0
Spinat	2	1	0	0	0	0
Gurken	12	10	5	3	1	1
Melonen	10	10	5	2	1	0
Tomaten	12	8	5	1	0,5	0
Kopfsalat	12	8	4	1	0,5	0
Lauch	1	1	0	0	0	0
Zwiebeln	1	0	0	0	0	0
Äpfel	12	10	5	2	0,5	0
Erdbeeren	12	8	5	1	0	0
Kirschen	8	5	3	0,5	0	0

Anmerkung: 1.) Die Zeitangaben beziehen sich auf wenigstens 90 % Überlebende.

2.) Die Fruchtsäfte waren erst nach obiger Angabe verträglich, als sie neutralisiert wurden.

mäßig erwies, aber nicht immer durchgeführt wurde, sei im folgenden beschrieben.

Zur Aufarbeitung gelangen 100 g Pflanzenmaterial, das 3 x unter Zusatz von Tweenwasser - 0,02 % Tween 80 in destilliertem Wasser - zerkleinert und zentrifugiert wird. Die 2. und 3. Zerkleinerung bzw. Durchmischung kann mit Hilfe eines Stabmixgerätes (Wigorex) in den Zentrifugenbechern erfolgen. Dadurch werden Umgießen und Nachspülen nicht mehr notwendig. Für die Zerkleinerung eignet sich am besten tiefgefrorenes Material, das am besten und schnellsten durch grobes Zerkleinern und anschließendes Vermischen mit Kohlendioxidschnee erhalten werden kann. Das Material wird zuerst ohne Wasserzusatz zerkleinert, dann erfolgt allmähliche Zugabe von Wasser von 40°C. Auf diese Weise können grobe Fasern, die sich sonst um die Schneidmesser des Mixgerätes wickeln und eine weitere Zerkleinerung verhindern, ebenfalls fein zerkleinert werden. Werden 120 + 150 + 150 ml Wasser verwendet, beträgt die Saftausbeute im Durchschnitt 480 ml. Die zu 500 ml fehlenden Mengen werden ergänzt (Verdünnungsstufe 10=2). Wird nach dem Zentrifugieren sofort dekantiert, treten nur wenige Schwebstoffe auf. Die vereinigten Preßsäfte werden nochmals zentrifugiert, wenn sie sofort ausgetestet werden sollen. Kann der Test erst am folgenden Tag durchgeführt werden, wird zentrifugiert, während das Tiermaterial vorbereitet wird. Zur Herstellung eines wässrigen Pflanzenauszuges wird folgende, in 8 Punkte unterteilte, Arbeitsweise empfohlen:

- 1.) 100 g Pflanzenmaterial grob zerkleinern und im Tiefkühlgerät oder mit Kohlendioxidschnee gefrieren lassen,
- 2.) zunächst so fein als möglich ohne Wasserzusatz im Stabmix zerkleinern,
- 3.) bei laufendem Gerät 120 ml Tweenwasser von 40°C allmählich zugeben, nach Zugabe des Wassers weitere 2 Minuten Gerät laufen lassen,
- 4.) Pflanzenbrei in Zentrifugenbecher überführen, Gerät mit wenig Wasser nachspülen,
- 5.) 15 Minuten bei höchster Tourenzahl zentrifugieren, danach sofort dekantieren,
- 6.) 150 ml Wasser zusetzen, mit Stabmixgerät bearbeiten und 15 Minuten zentrifugieren,
- 7.) 5.) und 6.) wiederholen,
- 8.) vereinigte Flüssigkeiten auf 500 ml ergänzen und nochmals zentrifugieren.

Modellversuche.

Die Anzahl der Wirkstoffe wurde in den Modellversuchen des Preßsaftverfahrens (= Verfahren mit wässrigen Pflanzenauszü- gen) gegenüber der Anzahl, die im Abwaschverfahren verwendet wurden, stark eingeschränkt. Die chlorierten Kohlenwasserstoffe wurden weggelassen, unter den Phosphorverbindungen wurde eine Auswahl nach der mutmaßlichen Häufigkeit ihrer Verwendung in der Praxis getroffen. Nach inzwischen gewonnenen Erfahrungen, die sich auf Auskünfte von Anbauern im Stadtbezirk Frankfurt stützten, kamen Kopfsalat, Blumenkohl, Gurken, Bohnen und To- maten als Untersuchungsgüter und Parathion, Phosdrin und Meta- systox als Wirkstoffe infrage. Die Anzahl der Untersuchungsgü- ter wurde um Erdbeeren, die der Wirkstoffe um Chlorthion, Dia- zinin, Gusathion und Malathion erweitert.

In Vorversuchen mit Preßsäften und zugesetzten Wirkstoffen konn- te keine Verschiebung der Wirksamkeit durch die Pflanzeninhalts- stoffe - innerhalb der schon erörterten zeitlichen Grenzen - beobachtet werden. Die Wirkstoffe wurden entweder mit einer Pipette aufgetragen oder, einem Vorschlag der Rückstandskom- mission der Deutschen Forschungsgemeinschaft folgend, während des Zerkleinerns des Untersuchungsgutes zugesetzt. Der Über- gang der Wirkstoffe in die wässrige Phase wurde durch Austesten der Extrakte der Zentrifugenrückstände überprüft bzw. sicherge- stellt. Das Geigy-Extraktionsgerät eignet sich für die Extraktion von fein zerkleinerten Pflanzenmaterialien nicht, es sei denn, der Zentrifugenrückstand wird mit so viel Natriumsulfat getrock- net, daß man eine steinharte, schwer zu zerkleinernde Masse er- hält. Die Erfahrungen, die mit Natriumsulfat-getrockneten Pfla- zenmaterialien bei der Extraktion nach H ü l l e r (117) und K o c h e r (86) gemacht wurden, waren nicht zufriedenstellend. Die Extrakte wurden durch Vermischen des Zentrifugenrückstandes mit einer Mischung von 10 Teilen Methylenchlorid und 90 Teilen Petroläther mit Hilfe des Stabmixgerätes hergestellt. Ohne Zu- satz von Natriumsulfat bildete sich eine stabile Emulsion, die sich weder durch Zentrifugieren noch durch Absaugen trennen ließ und die hydraulischen Drucken widerstand. Wurden während des wei- teren Durchmischens 50 ml einer gesättigten Natriumsulfatlösung

und anschließend 30 bis 50 g fein gepulverten, trockenen Natriumsulfats zugesetzt, wurden 3 Schichten erhalten, deren oberste die Petroläther/Methylenchlorid-Phase war. Sie wurde, wie bereits beschrieben, aufgearbeitet. Die Extraktion wurde einmal wiederholt.

Zur Test wurden 5 ml des Preßsaftes (10=2) in 5 ml Wohnwasser pipettiert, in dem sich 10 Zuchtdaphnien befanden. Der Extrakt wurde in Tween und Alkohol aufgenommen und auf 500 ml ergänzt.

E r g e b n i s s e :

Zusätze von 0,1 ppm und mehr von Diazinon, Gusathion, Parathion und Phosdrin und 0,5 ppm Chlorthion und Malathion konnten im Preßsaft nachgewiesen werden. Bei Zusätzen über 2 ppm bzw. 5 ppm wurde auch in den Extrakten eine Wirkung beobachtet. Quantitative Untersuchungen wurden nicht vorgenommen, da zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch keine befriedigende Methode für die Auszählung vorlag. Der Eintritt und weitere Verlauf der Schädigung ließ aber ohne weiteres erkennen, daß die Hauptmenge der Wirkstoffe in den wässrigen Auszug gelangt war. Die Angaben von W o l l e r m a n (163) und D o w l y (41) konnten bestätigt und dahingehend erweitert werden, daß nicht nur systemische Verbindungen, sondern auch andere Phosphorverbindungen in wässrigen Pflanzenauszügen mit Hilfe des Daphnientestes nachgewiesen werden können.

Diese Befunde lassen die Aussage zu, daß der Daphnientest in Preßsäften geeignet ist, auf Verdachtsproben in der Lebensmittelüberwachung Rückstände, die im Toleranzbereich oder darüber liegen, schnell erkennen zu lassen. Für die Herstellung der Preßsäfte von 3 Proben kann ein Zeitaufwand von 2 bis 2,5 Stunden angesetzt werden. Zum Test, einschließlich Vorbereitung des Tiermaterials, werden weitere 2 bis 6 Stunden benötigt, so daß innerhalb eines Arbeitstages Aufschluß über das Vorhandensein eines Rückstandes aus der Gruppe der Cholinesterasehemmer erhalten und je nach Eintritt der letalen Wirkung eine Schätzung der Höhe des Rückstandes vorgenommen werden kann.

Feldversuche.

Qualitative Untersuchungen.

Die Bestimmung von Rückständen auf Pflanzenmaterial, das im Freiland oder Frühbeet behandelt worden war, entsprach - wie auch alle vorausgegangenen Untersuchungen - den jeweiligen Ergebnissen der Zucht von Daphnien und bis dahin durchgeführter Verfahren. Im Sommer 1961 wurden Rückstände, deren Art bekannt war, lediglich qualitativ untersucht. Das Material, das von zuverlässigen Gärtnern bezogen werden konnte, war wegen des geringfügigen Auftretens von Insektenschädlingen nicht sehr umfangreich. Pflanzenmaterial, das im Gießverfahren mit chlorierten Kohlenwasserstoffen behandelt worden war, kam aus den geschilderten Gründen für einen Direkttest nicht infrage. In den Gartenbaubetrieben, die zunächst nur insoweit zur Verfügung standen, als nach Feldbehandlungen Proben entnommen werden konnten, traten Blattläuse auf Kopfsalat und Bohnen, rote Spinne auf Gurken und Raupen auf bzw. in Blumenkohl nur sehr vereinzelt auf, so daß fast keine Behandlungen durchgeführt werden mußten. Im Spätherbst traten an Rosenkohl kurz vor der Ernte Schmierläuse und eine nicht näher bestimmte Mottenart auf.

Kopfsalat wurde mit Sprühgeräten mit Parathion oder Phosdrin behandelt, an den anderen Pflanzenarten gelangte nur Phosdrin zur Anwendung. Nach Behandlung mit Phosdrin wurden die Proben am Behandlungstage (1.Tag), am 3. und 4. oder 5.Tag entnommen; nach Behandlung mit Parathion wurde am 1., 4., 7. und 15.Tag geerntet.

E r g e b n i s s e :

Die Abnahme der Rückstände wurde solange verfolgt, bis im Test (Saft 10=1) die letale Wirkung nach 6 Stunden ausblieb. Auf Bohnen waren die Rückstände so gering, daß am dritten Tag kein Phosdrin mehr nachgewiesen werden konnte. Auf Kopfsalat, Gurken und Blumenkohl konnte Phosdrin am 4. oder 5.Tag nicht mehr nachgewiesen werden, dabei war die Wirkung am 1.Tag so stark, daß

im Preßsaft 100 = 1 die Daphnien innerhalb 10 Minuten abgetötet worden waren. Diese Wirkung entsprach etwa 5×10^{-6} g/ml, d.h. die Höhe der Rückstände belief sich auf etwa 50 ppm. Auf Rosenkohl, der bei Temperaturwerten zwischen $+4^{\circ}\text{C}$ und $+10^{\circ}\text{C}$ behandelt werden mußte, waren Phosdrin-Rückstände noch nach einer Woche nachweisbar.

Insgesamt konnten mit den Untersuchungen an Material, das mit Phosdrin behandelt worden war, die Befunde über Phosdrin als kurzlebiges systemisches Insektizid bestätigt werden (35).

Parathion kam während zweier Behandlungen an Kopfsalat zur Anwendung, aber beide Male waren die Witterungsbedingungen für die Bildung dauerhafter Beläge nicht günstig. Die Pflanzen mußten regennaß behandelt werden; bis zum nächsten Regenfall war das Spritzmittel noch nicht angetrocknet. Die Rückstände befanden sich noch in der "excess-phase" und konnten durch den Regen gut abgewaschen werden. Am 7.Tag war nur noch eine geringe, subletale Wirkung zu beobachten, am 15.Tag war keine Wirkung mehr vorhanden.

Quantitative Untersuchungen.

Das bevorzugte Untersuchungsgut für die quantitativen Untersuchungen im Sommer 1962 war Kopfsalat. Folgende Überlegungen sprachen für diese Auswahl:

- 1.) Kopfsalat war im Anbaubereich um Frankfurt/Main seit Jahren in allen Entwicklungsstadien von Blattläusen befallen und mit organischen Phosphorverbindungen behandelt worden.
- 2.) Auf Kopfsalat können hohe Rückstände erwartet werden, weil keine anderen Pflanzenteile, wie etwa bei Bohnen das reichliche Blattwerk, das Spritzmittel zurückhalten.
- 3.) Kopfsalat steht während einer ganzen Anbauperiode - von April bis Oktober - zur Verfügung.

Daneben wurden an Blumenkohl, Tomaten, Bohnen und Erdbeeren Behandlungen durchgeführt.

Bei der Feldbehandlung von Salat wurde die Anbaufläche in Parzellen von 2 x 2 m mit einem Bestand von 20 bis 40 Pflanzen eingeteilt. Die Wirkstoffe wurden als 0,1 %ige Spritzbrühe mit einem Handspritzgerät oder zu 0,5 % mit einem Motorsprünger aufgebracht. Wenn nach 2 bis 3 Stunden die Spritzbrühe angetrocknet war, wurde die erste Probe entnommen. Bei Phosdrin wurden die nächsten Proben am 3.Tag, am 4.Tag oder am 5.Tag entnommen. Bei den anderen Wirkstoffen wurden größere zeitliche Abstände gewählt.

Bei einer Probenahme wurden jeweils 4 Salatköpfe, gleichmäßig über die Parzelle verteilt, geerntet. Nach dem Transport wurden sie vorzerkleinert und in einer geräumigen Schale gut durchmischt. 100 g wurden in der beschriebenen Weise bearbeitet. Im Verlaufe der Untersuchungen wurde dazu übergegangen, die Ernten einer Versuchsreihe vorzerkleinert einzufrieren und die Bestimmungen an einem Tag vorzunehmen.

Die Bestimmungen wurden in kegelförmig ausgezogenen Testgefäßen mit 5 x 10 Daphnien in 5 x 10 ml Testflüssigkeit durchgeführt (s.a.S.53). Die graphisch ermittelten LT_{50} -Werte wurden in eine Standardreihe eingesetzt, die gleichzeitig mit den Rückstandsuntersuchungen angesetzt wurde. Da die Standardkurven, die aus Pflanzensäften erhalten wurden, immer annähernd zu den Standardkurven parallel waren, die in Wohnwasser erhalten wurden, wurden 4 Werte, 2 im hohen Konzentrationsbereich und 2 im mittleren Konzentrationsbereich, für ausreichend erachtet.

Abb. 9 zeigt die graphische Ermittlung einer unbekannten Wirkstoffkonzentration anhand des LT_{50} -Wertes nach M o s e b a c h. Das Lot, das auf der Zeitachse errichtet wird, schneidet die Standardkurve im Punkte P; durch Ausloten des Punktes P auf die Konzentrationsachse wird der Punkt x erhalten, die gesuchte Konzentration. Die Menge eines Rückstandes wird durch Multiplikation der gefundenen Konzentration (c) mit dem Verdünnungsfaktor (n) ($10=1$; $n = 10$) und 10^6 in ppm erhalten.

$$R = c \times n \times 10^6 \text{ (ppm)}$$

Beispiel: Im Versuch 1.) wurde im Saft $40=1$ ($10=0,25$) der LT_{50} -Wert 39 min, entsprechend $1,04 \times 10^{-7}$ g/ml erhalten.

Berechnung: $1,04 \times 10^{-7} \times 40 \times 10^6 = 4,16 \text{ ppm} \approx$
 $4,2 \text{ ppm}$
 =====

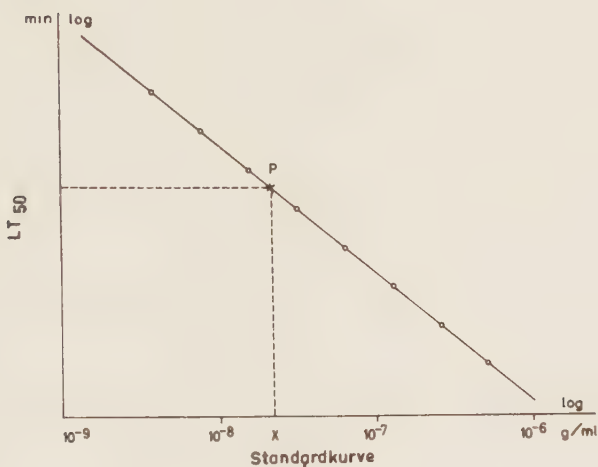


Abb. 9 Graphische Ermittlung eines Rückstandswertes.

Einzelne Versuche.

- 1.) Junge Salatpflanzen, die etwa 10 bis 15 Blätter entwickelt hatten und anfangen, Köpfe zu bilden, wurden im Frühbeetkasten mit einem Handspritzgerät mit Phosdrin 0,1 % behandelt. Die Probenahmenerfolgten am 1., 2., 4. und 8. Tag. Der Salat wurde täglich mit reichlich Wasser besprengt, danach wurden die Kästen wieder bis auf einen kleinen Lüftungsspalt geschlossen (Abnahme s. Abb. 10, Kurve 1).
- 2.) Drei ausgebildete Salatköpfe, die sich noch auf einem abgeernteten Feld befanden, wurden mit 0,5 % Phosdrin kräftig gespritzt. Da die Pflanzen weit auseinander standen, konnte keine annähernd gleiche Verteilung des Wirkstoffes wie in einer Parzelle erzielt werden.

- 3.) und 4.) Je 5 Blumenkohlpflanzen, deren Köpfe nahezu erntefähig waren, wurden mit 0,1 % Phosdrin in den Kopf gespritzt, schützende Blätter wurden vorher zurückgebogen. Bei jeder Ernte wurde aus den Köpfen ein Stück von 50 bis 100 g herausgeschnitten.
- 5.) Stangenbohnen, die in der Fruchtheregion stark belaubt waren, wurden mit 0,1 % Phosdrin besprüht, bis die außenstehenden Blätter deutlich benetzt waren.
- 6.) Unreife und halbreife Tomaten wurden auf einer Fläche von 10 m^2 mit 0,1 % Phosdrin besprüht. Bei den Probenahmen wurden je 10 Früchte unterschiedlicher Größe und unterschiedlichen Reifegrades geerntet.
- 7.) Kopfsalat (s.1.) wurde mit 0,1 % Metasystox gespritzt.
- 8.) Kopfsalat (s.1 und 7.) wurde mit 0,5 % Parathion besprüht.
- Diese Aufwandmenge ist nicht praxisüblich. Da von den Herstellern der Sprüngeräte und Wirkstoffe für das Sprühverfahren im allgemeinen die 3 bis 4-fache Konzentration empfohlen wird, entsprechen 0,5 % der 4 bis 5-fachen normalen Aufwandmenge (Parathion für Spritzgerät 0,035 %; für Sprüngerät $0,035 \times 4 = 0,14 \%$). -
- 9.) Kopfsalat im Freiland, bei dem sich bereits Köpfe gebildet hatten, wurde mit 0,035 % Parathion gespritzt, bis die Pflanzen gut angefeuchtet waren.
- 10.) Auf demselben Feld wurde Kopfsalat mit 0,1 % Chlorthion gespritzt. Die Pflanzen innerhalb der Parzelle waren recht unterschiedlich entwickelt.
- 11.) In einem Versuch, der nicht den Erfordernissen der Praxis entsprach, wurden Erdbeeren kurz vor der Ernte mit Diazinon 0,1 %, Gusathion 0,1 %, Parathion 0,05 %, Phosdrin 0,1 % und Dimethoat 0,1 % gespritzt. Je eine Reihe von 4,5 m Länge und 30 bis 40 cm Breite wurde mit 500 ml Spritzbrühe behandelt. Die Sorte Senga Sengana, die für diesen Versuch zur Verfügung stand, ist stark belaubt, die meisten Früchte sind von einer 2- bis 4-fachen Blätterschicht bedeckt. Bei den Probenahmen, die am 1., 2., 3. und 8.Tag erfolgten, wurden die reifen und halbreifen Früchte gepflückt. Sie wurden gut durchmischt. Dann wurden wahllos einige Früchte jeder Größenklasse entnommen, bis 100 g erreicht waren.

E r g e b n i s s e :

Tab. 13 Rückstandswerte der Versuche 1 bis 11.

Versuch	Rückstandswerte			
1	Kopfsalat / Phosdrin			
Tag	1.	2.	4.	8.
ppm	10,6	4,2	2,1	0,7
2	Kopfsalat / Phosdrin			
Tag	1.	2.	3.	
ppm	160	20	0,3	
3	Blumenkohl / Phosdrin			
Tag	1.	2.	3.	
ppm	3,1	0,7	0,17	
4	Blumenkohl / Phosdrin			
Tag	1.	2.	3.	
ppm	3,0	/	0,28	
5	Bohnen / Phosdrin			
Tag	1.	2.	3.	
ppm	0,07	(Wirkung festgestellt)		
6	Tomaten / Phosdrin			
Tag	1.	2.	3.	
ppm	0,4	0,06	(Wirkg.festgest.)	
7	Salat / Metasystox			
Tag	1.	4.	8.	
ppm	2,0	3,0	2,8	
8	Salat / Parathion			
Tag	1.	8.	15.	20.
ppm	35	12,5	1,4	(Wirkung)
9	Salat / Parathion			
Tag	1.	2.	5.	10.
ppm	1	0,5	0,15	(Wirkung)
10	Salat / Chlorthion			
Tag	1.	2.	5.	10.
ppm	4,0	2,5	0,25	(Wirkung)

Tab. 13 - Fortsetzung

Versuch	Erdbeeren / Phosdrin				
11a	Tag	1.	2.	3.	8.
	ppm	0,4	0,16	0,28	/
11b	Erdbeeren / Gusathion				
	Tag	1.	2.	3.	8.
	ppm	0,5	0,7	0,56	0,28

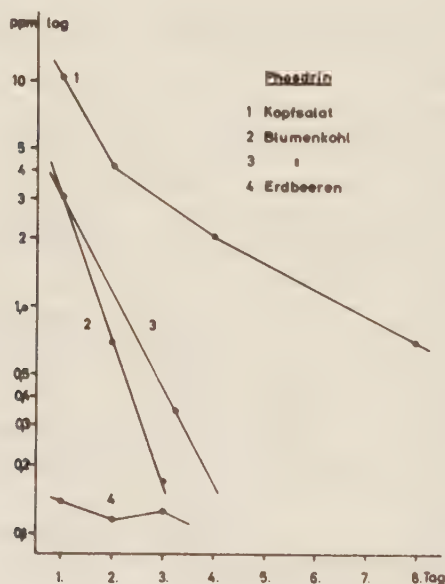


Abb. 10 Abnahme der Rückstände von Phosdrin.

Kurve (1) = Versuch 1., Kurve (2) = Versuch 3.
 Kurve (3) = Versuch 4., Kurve (4) = Versuch 11a.

Anmerkungen:

zu 1.), Kurve (1). Die nicht-lineare Abnahme der Rückstände kann auf die gleichzeitige starke Bodenbehandlung und die

damit verbundene, laufende Zufuhr des systemischen Wirkstoffes zurückzuführen sein.

zu 2.) Dieser Versuch entspricht weder nach der Aufwandmenge, noch nach der Art der Behandlung zur Zeit der Erntefähigkeit dem in der gärtnerischen Praxis geübten Vorgehen. Da nur 3 Pflanzen zur Verfügung standen, konnten keine Durchschnittsproben entnommen werden. Zur Zeit des Versuchs betrugen die durchschnittlichen Tagestemperaturen 17°C und 16°C mit Höchstwerten von 24°C . Bei sommerlichen Temperaturen scheint Phosdrin sehr schnell abgebaut zu werden.

zu 3.) und 4.) Zur Zeit des Versuchs betrugen die durchschnittlichen Tagestemperaturen $19,3^{\circ}\text{C}$ bis $21,7^{\circ}\text{C}$ mit Höchstwerten zwischen 22°C und 28°C . Auch hier wurde der Wirkstoff innerhalb von 3 Tagen abgebaut und war am 4.Tag nicht mehr nachweisbar.

zu 5.) Es gelten die Temperaturwerte von 3. und 4. Das Blattwerk scheint die Bildung von Rückständen entscheidend zu beeinflussen.

zu 6.) Die Anwendung entspricht der Praxis, wenn die Pflanzen plötzlich von Läusen stark befallen werden, was im Sommer 1962 öfters und anhaltend der Fall war.

zu 7.) Die langsame Eliminierung des Metasystox ist bekannt. Doch scheint die über 10 Tage gleichbleibende Rückstandswirkung durch die Bildung der stärker wirksamen Metabolite zustande gekommen zu sein. Die Trennung der Systox-Metabolite konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen werden. Aus diesem Grunde konnte die Vermutung experimentell nicht bewiesen werden.

zu 8.) Die Abnahme der Rückstände zwischen dem 8. und 15.Tag kann damit erklärt werden, daß die behandelten Blätter inzwischen abgestorben oder von Schnecken und Würmern vertilgt worden waren. Am 20.Tag waren auf den Teilen der Salatköpfe, die selbst bei äußerster Ausnutzung der eßbaren Anteile erhalten wurden, keine Rückstände mehr feststellbar.

zu 9.) und 10.) Die Niederschläge waren während der Versuchsdauer unmeßbar klein, die mittleren Tagestemperaturen stiegen von $14,5^{\circ}\text{C}$ auf $24,2^{\circ}\text{C}$, die Höchstwerte von $17,9^{\circ}\text{C}$ bis $29,4^{\circ}\text{C}$ an.

zu 11.) Die Säfte waren erst verwendungsfähig, nachdem sie mit Natronlauge neutralisiert worden waren. Der Test wurde in der Verdünnungsstufe $20:1$ durchgeführt.

Bei Parathion und Diazinon konnte zwar eine Wirkung festgestellt werden, jedoch lag die Mortalität nach Ablauf der Versuchsdauer von 6 Stunden unter 20 %. Daraus lassen sich Rückstandswerte von weniger als 0,2 ppm abschätzen.

Dimethoat, das erst im Jahre 1962 amtlich zugelassen wurde, gehört zu den phytometatoxischen systemischen Wirkstoffen von geringer Warmblütertoxizität. Es war erwartet worden, daß in der Pflanze wirksame Metabolite gebildet würden. Die Versuchsergebnisse sprachen nicht dafür. Dimethoat ist unter allen Insektiziden die Verbindung, die sich im Daphnientest am schwersten nachweisen läßt. Selbst Rückstände im Bereich von 50 bis 100 ppm dürften schwer zu erfassen sein.

Phosdrin (Abb. 10, Kurve 4) und Gusathion bildeten nachweisbare Rückstände. Der Abbau des Phosdrin auf Erdbeeren entsprach nicht den Gesetzmäßigkeiten, die besonders bei Blumenkohl gut zu erkennen sind. Die Ursache hierfür kann die Erde sein, die sehr vielen Früchten anhaftete und in der Phosdrin nicht abgebaut worden sein dürfte.

Insgesamt lassen die Ergebnisse, die mit der unsachgemäßen Anwendung einiger Wirkstoffe auf Erdbeeren erzielt wurden, erkennen, daß reichliches Blattwerk die Bildung von bedenklichen Rückständen verhindern kann.

Nachtrag.

An Handelsware wurden keine Rückstandsbestimmungen vorgenommen.

C. Dünnschichtchromatographie.

Bei der Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Trennung lipophiler Substanzen kann der gesamte Erfahrungsschatz der Papierchromatographie übernommen werden. Diese Überlegung gilt insbesondere für Farbreaktionen, die der Identifizierung farbloser Stoffe dienen. Darüber hinaus können auf der Dünnschichtplatte Tüpfelreaktionen mit starken Säuren oder bei hohen Temperaturen durchgeführt werden, die die Zellulosesubstanz der Papierchromatogramme nicht zuläßt. Während zur Trennung lipophiler Substanzen das Papier hydrophobiert werden muß, kann die Dünnschichtplatte sofort, ohne zusätzliche Präparierung, verwendet werden; dazu kommt, daß die Laufzeiten der Dünnschichtchromatogramme mit 20 Minuten bis 2 Stunden erheblich kürzer sind als die Zeit von 8 bis 16 Stunden, die bei den Verfahren der umgekehrten Phasen notwendig ist. Der wesentlichste Gesichtspunkt jedoch, der bedacht werden muß, ist der, daß mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie sehr geringe Substanzmengen aufgetrennt werden können, wo die Papierchromatographie kein befriedigendes Ergebnis liefert.

Die Herstellung der Dünnschichtplatten bedarf eines größeren zeitlichen und apparativen Aufwandes. Dieser Umstand schränkt die angeführten Vorteile etwas ein. Ebenfalls wenig vorteilhaft ist, daß Dünnschichtchromatogramme nicht aufbewahrt werden können.

Nachdem mit einigen Phosphorverbindungen papierchromatographische Trennungen nach C o o k (30) und J u c k e r (79) durchgeführt worden waren, wurde aus den angeführten Gründen zur Dünnschichtchromatographie übergegangen. Da es sich bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen und organischen Phosphorverbindungen um lipophile Stoffe handelt, konnte erwartet werden, daß sie sich auf der Dünnschichtplatte trennen lassen würden.

Beschichtung der Platten.

Zur Beschichtung der Glasplatten standen die Arbeitsgeräte der Firma *D e s a g a* zur Verfügung. Die Platten wurden mit Kieselgel "G", Merck, beschichtet. Es erwies sich als vorteilhaft, die Arbeitsvorschrift in zwei Punkten abzuändern.

- 1.) Die Menge des Kieselgels wurde von 30 g auf 20 g reduziert. 20 g reichten aus, um 5 Platten 20 x 20 cm gleichmäßig zu beschichten.
- 2.) Das Anschlammern des Kieselgels erfolgte durch Anschüttern in einem 100 ml-Jodzahlkolben. Dadurch konnte die Zeit von einer Minute, die nach Vorschrift nicht überschritten werden soll, genau eingehalten werden.

Bei Bedarf wurden Reagentien in die Kieselgelschicht eingearbeitet. Die Platten mußten in diesen Fällen gleichmäßig getrocknet werden. Die Gleichmäßigkeit des Antrocknens der Kieselgelschicht wurde erreicht, wenn die Platten eine halbe Stunde beiseite gestellt, dann in einem Warmluftstrom kurz erwärmt und 2 Stunden lang bei 120°C nachgetrocknet wurden.

Fließmittel und Farbreagentien.

Bei der Überprüfung einiger Lösungsmittel auf ihre eluierenden Eigenschaften wurden für die Farbreaktionen Reagentien verwendet, die von *C o o k* (30), *K l e i n* (83,84), *M i t c h e l l* (111, 112, 113, 114) und anderen (79,84,149) in der Papierchromatographie angewendet worden waren. Es sind dies Brom/Fluoresceïn, Silbernitrat und Ammoniummolybdat in Perchlorsäure.

Bei Anwendung des Brom/Fluoresceïn-Reagens war es gleichgültig, welche der beiden Komponenten zuerst einwirken gelassen wurde. Nahezu alle Verbindungen ergaben eine Reaktion, die sich vereinzelt im sichtbaren Licht, aber immer bei Betrachtung im ultravioletten Licht zu erkennen gab. Auch Verbindungen von der Art des DDT und des Dieldrin konnten sichtbar gemacht werden, obwohl ihre Konstitution eine Reaktion mit Brom unter den gegebenen Bedingungen nicht erwarten läßt. Silbernitrat ergab ebenfalls mit

den meisten Verbindungen eine Reaktion. Das Ammoniummolybdat-Reagens bewährte sich nicht. Lediglich Delnav erschien sofort als blauer Fleck, die übrigen Phosphorverbindungen reagierten entweder nicht oder sehr undeutlich beim starken Erhitzen der Platten. Wurde ein Reduktionsmittel nach der Anwendung des Ammoniummolybdats aufgesprüht und durch Ammoniakdämpfe alkali-siert, wurde die ganze Platte blau.

Stark polare Lösungsmittel wie Methanol, Aethanol, Isopropanol, Aceton, Acetonitril, Dimethylformamid, Diäthyläther, Essig-ester, Essigsäure und Ameisensäure schieden als ungeeignet aus.

E r g e b n i s s e :

Alle paraffinischen Lösungsmittel wie Pentan, Hexan, Heptan, Isooctan, Cyclohexan und Dekalin ließen die Phosphorverbindungen am Startpunkt zurück, während die chlorierten Kohlenwasserstoffe ohne Ausnahme Rf-Werte bildeten. In Mischung mit Chloroform, Methylenchlorid, Benzol, Toluol und Xylol bewirkten die Paraffine eine anteilmäßige Verminderung der Rf-Werte der organischen Phosphorverbindungen. Umgekehrt wurden bei den chlorierten Kohlenwasserstoffen höhere Rf-Werte durch geringe Zusätze der oben genannten Lösungsmittel zu den paraffinischen Lösungsmitteln erzielt. Die Mischungen Methylenchlorid : Petroläther (Kp. 35°C) = 10 : 90 und 20 : 80 (v/v) hatten die besten Fließeigenschaften, verdampften aber ausserordentlich leicht und waren nach 2 bis 3-maligem Gebrauch nicht mehr verwendungs-fähig. Andererseits war im Hinblick auf die Silbernitratreaktion die hohe Flüchtigkeit eines Fließmittels erwünscht, das einen chlorierten Kohlenwasserstoff als Komponente enthielt.

Die Reaktion der chlorierten Kohlenwasserstoffe mit Silbernitrat konnte durch zweimaliges Belichten mit ultraviolettem Licht so-weit vereinfacht werden, daß Nachbehandlungen der Chromatogramme mit konzentrierter Salpetersäure/Perhydrol/Formalin nicht mehr notwendig waren. Die Abb. 11 und 12 zeigen Chromatogramme, die in Methylenchlorid/Petroläther entwickelt und auf nachstehende Weise sichtbar gemacht wurden.

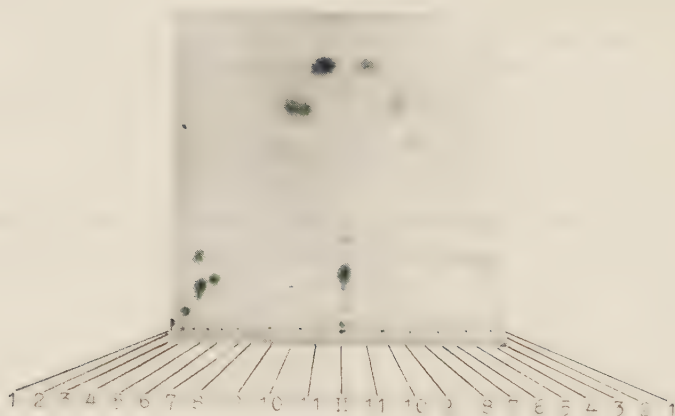


Abb. 11 Dünnschichtchromatogramm chlorierter Kohlenwasserstoffe

1=Chlorbenzilat, 2=Alodan, 3=Kelthan, 4=Dieldrin, 5=Endrin, 6= γ -HCH, 7=HCH-Isomere, 8=Chlorparacid, 9=DDT, 10=Triodan, 11=Aldrin, M = Mitte = 1 bis 5.

Fließmittel: Methylenchlorid : Petroläther = 10 : 90 (v/v)

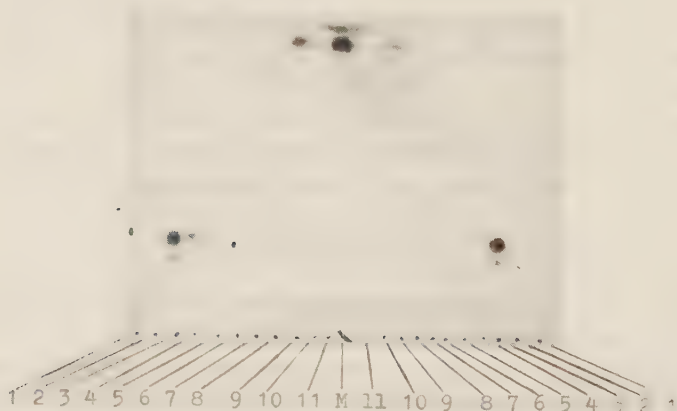


Abb. 12 Dünnschichtchromatogramm chlorierter Kohlenwasserstoffe

1 bis 11 s. Abb. 11, Mitte = 6 bis 11

Fließmittel: Methylenchlorid : Petroläther = 20 : 80 (v/v)

Nach dem Entfernen des Fließmittels durch leichtes Erwärmen der Platten und nach halbstündiger Aufbewahrung im Vakuum wurden die Chromatogramme kurz in Ammoniakdämpfe gehalten und 20 Minuten mit einer UV-Lampe belichtet. Dann wurden die Chromatogramme mit einer Mischung von 0,02 N Ammoniak und 0,01 N Silbernitrat in bidestilliertem Methanol besprüht, bis sie schwach, aber gleichmäßig durchfeuchtet waren, mit einem Föhn getrocknet, nochmals kurz in Ammoniakdämpfe gehalten und belichtet. Allmählich entwickelten sich graubraune Flecke auf hellem Untergrund. Aldrin und Kelthan erschienen nach 5 bis 10 Sekunden, es folgten Thiodan, Alodan, Dieldrin und Endrin nach 15 bis 20 Sekunden, DDT, Chlorbenzilat, Chlorparacid (Ovicid), die Hexachlorcyclohexan-Isomeren nach 20 bis 40 Sekunden, Toxaphen und Stroban, die nicht abgebildet sind, benötigten mehr als 40 Sekunden. Bei längeren Belichtungszeiten als 30 Sekunden wird der Untergrund ebenfalls braun, so daß sich die Flecke nur noch unwesentlich abheben. Die abgebildeten Chromatogramme sind 25 sec lang belichtet, weswegen γ -HCH und seine Isomeren nicht sichtbar gemacht werden konnten.

Alodan, Kelthan und Dieldrin lassen deutlich zwei Isomere erkennen. Bei Alodan scheinen die Isomeren mengenmäßig gleich verteilt zu sein, bei Kelthan überwiegt das Isomere mit dem höheren Rf-Wert, bei Dieldrin überwiegt das Isomere mit dem kleineren Rf-Wert. Bemerkenswert ist, daß gleiche Mengen der Isomeren Dieldrin und Endrin unterschiedlich stark reagieren. Der Vergleich der Rf-Werte der Verbindungen 1 bis 5 auf Abb. 11 zeigt, daß es nicht einmal auf einem Chromatogramm möglich ist, gleiche Rf-Werte zu erzielen. Teilweise hängen unterschiedliche Rf-Werte einer Substanz von der aufgetragenen Konzentration ab. Bei Abb. 11 sind links ungefähr 10^{-5} g aufgetragen, rechts ungefähr 3×10^{-6} g. In Abb. 12 sind links und rechts 10^{-5} g aufgetragen. Die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei Kelthan und Aldrin unter 10^{-6} g, bei Thiodan, Alodan, Dieldrin und DDT um 10^{-6} g, bei γ -HCH und Endrin bei 5×10^{-6} g, beim Isomerengemisch des HCH, Toxaphen und Stroban um 10^{-5} g.

Rückstandsbestimmungen.

Modellversuche.

Die Modellversuche beschäftigten sich zunächst mit den Fließ-eigenschaften ungereinigter und gereinigter Extrakte verschiedener Pflanzenmaterialien. Die Reinigung der Extrakte erfolgte nach den Angaben auf S. 72. Als Fließmittel dienten Gemische von Methylenchlorid und Petroläther. Es zeigte sich, daß mit Erhöhung des Methylenchlorid-Anteils um so mehr Extraktstoffe eluiert wurden. Der Reinigungsvorgang wurde danach um die Behandlung mit rauchender Schwefelsäure nach M ü l l e r (117) erweitert. Der Extrakt, der nach der Verteilung zwischen der Petroläther- und der Acetonitril/Wasserphase erhalten worden war, wurde nach Einengen auf 10 ml mit 20 ml rauchender Schwefelsäure (5 % SO_3) kräftig geschwenkt. Beim Schütteln entstanden stabile Emulsionen. Durch Filtration durch Kaliumcarbonat und Natriumsulfat wurden Säurereste und Wasserreste entfernt. Das Schwefelsäureverfahren konnte die Eigenschaften der Extrakte nur unwesentlich verbessern. Wurden Extraktmengen aufgetragen, die 10 g Pflanzenmaterial entsprachen, und wurden die Chromatogramme mit Fließmittelgemischen entwickelt, die weniger als 20 Teile Methylenchlorid enthielten, wurden die meisten Extraktstoffe am Startpunkt zurückgehalten. Mit Brom/Fluorescein und Ammoniummolybdat wurden jedoch über die ganze Lauffläche hinweg Farbreaktionen erhalten. Mit Silbernitrat blieb die Spanne zwischen R_f 0,25 (bis 0,3) und R_f 0,9 ohne Reaktion. Bei zweidimensionaler Entwicklung der Chromatogramme ließ sich dieses Ergebnis verbessern. Die Zone vom Startpunkt bis R_f 2,5 wurde von gefärbten Extraktstoffen eingenommen, die Zone zwischen R_f 2,5 und R_f 0,9 wurde durch Silbernitrat nicht beeinflusst, im Bereich R_f 0,9 bis R_f 0,95 entstand beim Besprühen sofort ein gelbbrauner Fleck, der Bereich bis zur Lösungsmittelfront blieb wiederum frei von jeder Reaktion. Diese Beobachtung wurde an Extrakten verschiedener Pflanzen gemacht, die unterschiedliche Wachs- und Farbstoffgehalte aufwiesen.

Nach diesem Befund war zu erwarten, daß sich einige chlorierte Kohlenwasserstoffe in grob gereinigten Extrakten nachweisen

lassen würden. Die folgenden Untersuchungen wurden mit Extrakten von Kohlsorten vorgenommen, die sich am schwierigsten reinigen ließen. Einer Extraktmenge, die 10 g Pflanzenmaterial entsprach, wurden 10^{-5} eines Wirkstoffes zugesetzt, dann wurde der Extrakt dem Reinigungsverfahren unterzogen.

E r g e b n i s s e :

Chlorierte Kohlenwasserstoffe, deren Rf-Werte zwischen Kelthan und Aldrin liegen, können dünnschichtchromatographisch aus grob gereinigten Extrakten mit dem Fließmittelgemisch Methylenchlorid : Petroläther = 10 : 90 isoliert und mit Silbernitrat nachgewiesen werden, wenn die Auftrennung zweidimensional mit demselben Fließmittelgemisch erfolgt. Solche Verbindungen sind Kelthan, ein Isomeres des Alodan, γ -HCH, DDT, Toxaphen, Thiodan und Aldrin.

Die Extraktstoffe, die am Startpunkt verbleiben, hemmen die Elution der Wirkstoffe in der ersten Fließrichtung. Diese Retention bedingt, daß keine kreisrunden, sondern stabförmige Flecke erhalten werden.

Chlorbenzilat, ein Alodan-Isomeres, Dieldrin und Endrin lassen sich auf diese Weise nicht isolieren.

Ein Feldversuch.

Rettiche wurden im Gießverfahren mit 0,1 % Aldrin behandelt. Die Proben wurden nach dem Antrocknen des Gießmittels, am 4. und am 8. Tag entnommen. Die Erde wurde abgeklopft, danach wurden die Rettiche geschabt. Das Abgeschabte und die Wurzel wurden getrennt untersucht.

E r g e b n i s s :

Im abgeschabten Wurzelanteil konnte bei allen drei Ernten Aldrin nachgewiesen werden. Im Rettich selbst konnte nur nach der ersten Ernte Aldrin nachgewiesen werden. Da mit diesem Verfahren Dieldrin nicht erfaßt werden kann, konnte die Umwandlung des Aldrin zu Dieldrin nicht beobachtet werden.

III . Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit weist in einer Literaturübersicht auf das Zustandekommen und Verhalten von insektiziden Rückständen, auf toxikologische Eigenschaften der Wirkstoffe und auf einige gruppenspezifische analytische Verfahren hin, die dem Nachweis von Rückständen dienen können.

Die Arbeit berichtet über die Zucht von *Daphnia magna* (Straus), über ihre Eignung als Testorganismus für den Nachweis von Insektizidrückständen auf frischem Obst und Gemüse und über ein einfaches dünnschichtchromatographisches Verfahren für chlorhaltige Wirkstoffe.

1.) Es wird ein Verfahren zur Laborzucht von Daphnien beschrieben, das dem Bedarf an Testtieren und der Weiterzucht nachkommt. Weibliche Daphnien werden ihrer natürlichen Umgebung entnommen und mit einer Kombination von frischer Bäckerhefe und einzelligen Grünalgen gefüttert. Die Nachkommen bilden die rotbraunen Pigmente am besten aus, wenn der Zuchtflüssigkeit täglich eine Kombination von Vitamin B₁, E, Biotin und Folsäure zugesetzt wird. Die Nachkommenschaft ist voll lebensfähig und kann über beliebig viele Generationen weitergezüchtet werden. Die besten Zuchtergebnisse werden in 1-Liter-Gefäßen mit einem Besatz von etwa 100 Zuchttieren erzielt. Licht und Wärme beeinflussen neben der Ernährung den Zuchterfolg nachhaltig.

2.) Die einzellige Alge *Ankistrodesmus falcatus*, die als Futter dient, muß ebenfalls in einer Laborzucht gewonnen werden. Günstige Wachstumsbedingungen in einer künstlichen Zuchtflüssigkeit sind durch Zusätze von Spurenelementen und durch künstliche Beleuchtung gegeben, wenn der Zuchtansatz gleichzeitig mit kohlenstoffhaltiger Luft durchströmt wird. Werden Algen und Daphnien in einem Raum gezüchtet, muß wegen der Gefahr der Anreicherung von Kohlendioxyd laufend gelüftet werden.

3.) Daphnien sind sehr empfindlich gegen Spuren von lipophilen Lösungsmitteln und gegen Kohlendioxyd.

4.) Daphnien durchlaufen unter der Einwirkung von Insektiziden einige charakteristische Exzitations- und Tremorphasen, die durch anorganische Gifte und organische Fungizide nicht ausgelöst werden. Bei genauer Beobachtung der Vergiftungssymptome lassen sich zwei Gruppen von Wirkstoffen gegeneinander abgrenzen: die chlorierten Kohlenwasserstoffe einerseits und die Hemmstoffe der Cholinesterasen andererseits. Einzelne Verbindungen lassen sich im Daphnientest nicht charakterisieren. Angaben, die darüber schon gemacht wurden, müssen als Wunschnoten bezeichnet werden.

5.) Die letale Wirkung einer toxischen Verbindung gegen Daphnien hängt allein von ihrer Konzentration in der Testflüssigkeit und nicht von ihrer Gesamtmenge ab. Darum wird bei den Versuchen die Wirkstoffmenge immer in Gramm pro Milliliter (g/ml) angegeben. Chlorierte Kohlenwasserstoffe sind bei gleichen Konzentrationen weniger wirksam als organische Phosphorverbindungen, d.h. ihre Konzentration muß entsprechend erhöht werden, um in gleichen Zeiten gleiche Wirkungen hervorzurufen.

6.) Die Empfindlichkeit der Daphnien hängt von ihrem Lebensalter, ihrem Geschlecht, ihrer Umwelt und ihrem Ernährungsgrad ab. Die aus der Zucht hervorgegangenen Daphnien sind empfindlicher als entsprechende Tiere aus Freilandpopulationen. Die Testtemperatur beeinflusst die Empfindlichkeit ebenfalls nachhaltig.

7.) Ein Auszählverfahren, das die letal geschädigten Daphnien in den Spätphasen der Intoxikation erfassen läßt, ermöglicht die Durchführung quantitativer Untersuchungen. Eine Testreihe, der der Wirkstoff in geometrischer Progression mit dem Faktor 2 zugesetzt wird, ergibt graphisch ermittelte LT_{50} -Werte; die Logarithmen der LT_{50} -Werte werden gegen die Logarithmen der Konzentration aufgetragen und ergeben eine Gerade, die Standardkurve. Die Standardkurve verschiebt sich bei Änderung der Testtemperatur parallel.

8.) Die Testgefäße können einfach, wenngleich immer noch zeitraubend gereinigt werden.

9.) Einige Thio- und Dithiophosphorsäureester lassen sich durch Brom in stärker wirksame Verbindungen überführen. Eine besonders deutliche Steigerung der Wirksamkeit läßt sich an Chlorthion, Ethion, Gusathion und Parathion beobachten. Diazinon dagegen büßt seine Wirksamkeit ein. Dieser Befund kann unter Umständen als Beitrag zur qualitativen Unterscheidung von Insektiziden mit Hilfe eines biologischen Testes gewertet werden.

10.) Der unterschiedliche Wirkungsgrad zwischen chlorierten Kohlenwasserstoffen und Phosphorverbindungen wird deutlich gezeigt. Er beträgt im Mittel 2 Zehnerpotenzen, um die die chlorierten Kohlenwasserstoffe weniger wirksam sind. Metasystox und Dimethoat sind so wenig wirksam wie die chlorierten Kohlenwasserstoffe.

11.) Feste Beläge von Insektiziden können mit Hilfe eines Lösungsvermittlers in ein wässriges System überführt werden. Dies zeigen Abwaschversuche an Glas, an Pflanzenmaterial, auf das die Beläge unter Laborbedingungen aufgebracht wurden, und an Pflanzenmaterial, das im Freiland behandelt wurde.

12.) Verdünnte Pflanzensäfte eignen sich weitgehend für einen Direkttest mit Daphnien. Ausgenommen sind die Säfte von Spinat, Zwiebelgewächsen und von Pflanzen mit einem hohen Gehalt an ätherischen Ölen. Unter Zusatz von Tween-haltigem Wasser wird das Pflanzenmaterial dreimal zerkleinert bzw. durchmischt und zentrifugiert.

13.) Modellversuche mit Pflanzenmaterial, dem phosphororganische Wirkstoffe zugesetzt wurden, und Feldversuche zeigen, daß die Wirkstoffe in den wässrigen Pflanzenauszug gehen. Zusätze bzw. Rückstände, die über ein ppm liegen, werden in kurzer Zeit erfaßt. Gereinigte Extrakte, die aus dem Pflanzenmaterial der Modellversuche hergestellt wurden, sind nur bei hohen Wirkstoffzusätzen wirksam.

14.) Die Feldversuche mit Phosdrin an Kopfsalat, Blumenkohl, Rosenkohl, Tomaten, Bohnen, Gurken und Erdbeeren bestätigen die kurze Lebensdauer dieses Wirkstoffes.

15.) Insektizide lassen sich dünnstichtchromatographisch auftrennen und mit unspezifischen Farbreagentien sichtbar machen. Mit Silbernitrat kann die Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe erfaßt werden. Die Farbreaktion wird durch längeres Bestrahlen der entwickelten Chromatogramme mit ultraviolettem Licht vor dem Aufsprühen des Silbernitrats und durch kurzes Belichten danach erreicht. Weitere Maßnahmen sind nicht notwendig.

Mit dem Fließmittelgemisch Petroläther/Methylenchlorid 90 : 10 (v/v) werden die chlorierten Kohlenwasserstoffe gut getrennt. Das gleiche Gemisch läßt die meisten Extraktstoffe grobgeinigter Pflanzenextrakte am Startpunkt zurück. Dieser Befund kann zur Isolierung einiger Verbindungen ausgenutzt werden. Bei einer Rückstandsbestimmung an Rettichen konnte mit diesem Verfahren Aldrin nachgewiesen werden.

Schlußbetrachtung.

Die Vielfalt toxischer Wirkstoffe, die auf Lebensmitteln als Rückstände auftreten können, stellt die amtliche Lebensmittelüberwachung vor schwierige analytische Probleme. Chemisch-analytische Bestimmungsverfahren, die wirkstoff-spezifisch sind, scheiden zunächst aus, da bei Verdacht auf Rückstände unbekannter Art nicht auf einzelne Wirkstoffe nacheinander untersucht werden kann. Freilich würde die Anwendung spezifischer Verfahren, analytisch gesehen, letzten Endes zum Erfolg führen, bliebe aber aus der Sicht des Verbrauchers wirkungslos, da beim Vorliegen der Untersuchungsergebnisse die Ware bereits verzehrt sein könnte. Ein weiterer Gesichtspunkt, der die Anwendung chemischer Methoden allein unvorteilhaft erscheinen läßt, ist der, daß die Bestimmung von Rückständen nur ein kleiner Teil des Aufgabengebietes der Lebensmittelüberwachung ist und daß sie demnach in den großen Rahmen eingepaßt werden müßte. Mit aufwendigen spezifischen Verfahren wird dieser Rahmen gesprengt.

Die Lebensmittelüberwachung betrachtet das Auftreten von Rückständen unter einem anderen Blickwinkel als die Stellen, die sich mit dem Verhalten von Rückständen bekannter Verbindungen und deren Analytik - bis zur bestmöglichen Nachweisgrenze - befassen. Für die Lebensmittelüberwachung gelten die Toleranzwerte als Richtgrößen. Sie sind so hoch - von Ausnahmen abgesehen - daß sich Rückstandsmengen, die in oder über diesem Bereich liegen, mit weniger aufwendigen Verfahren nachweisen lassen.

Zur Vororientierung eignet sich ein biologischer Test. Die vorliegende Arbeit hat sich mit *Daphnia magna* als Testorganismus befaßt. Danach ist die Frage zu stellen, ob Daphnien geeignet sind. Wie jeder andere Testorganismus müssen Daphnien im Labor gezüchtet werden und verursachen damit einen beträchtlichen Aufwand an Arbeit und Platz. Nach den vorliegenden Erfahrungen muß die Pflege der Daphnien sorgfältig und intensiv sein. Alle

Nebenarbeiten eingeschlossen, muß dafür pro Tag $1/2$ bis $3/4$ Stunde angesetzt werden. Ihre Empfindlichkeit reicht aus, um innerhalb 4 bis 5 Stunden - die Vorbereitung des Materials eingerechnet - auf Hemmstoffe der Cholinesterasen anzusprechen, die im Bereich von 1 ppm liegen. Kann durch weitere Untersuchungen ein Verfahren erarbeitet werden, das die Bromoxydation im Untersuchungsgut zuläßt, können wenigstens drei Gruppen von Wirkstoffen gegeneinander abgegrenzt bzw. das Vorhandensein wenigstens zweier Gruppen ausgeschlossen werden.

Ihre Empfindlichkeit gegenüber allen chlorierten Kohlenwasserstoffen und gegen das häufig angewendete Metasystox ist unbefriedigend. F r e h s e ⁺ hat darum in einem Vortrag, der anlässlich einer Tagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker gehalten wurde, die Ansicht vertreten, den Daphnientest mit weiteren biologischen Verfahren in der Weise zu ergänzen, daß gleichzeitig andere Testorganismen anderer Empfindlichkeit herangezogen werden. Diese Ansicht kann übernommen werden, wenn sich die zusätzlichen Testorganismen ohne großen Aufwand züchten lassen. Zur Ergänzung des Daphnientestes kommen nach den Informationen aus der Literatur am ehesten Guppies infrage, deren Empfindlichkeit fast in umgekehrter Reihenfolge als die der Daphnien verläuft. Dem Vorschlag Frehses zu folgen und mehrere Testorganismen gleichzeitig zu verwenden, wäre unökonomisch und undurchführbar, denn der Rahmen eines Untersuchungsamtes läßt nicht den Aufwand an biologischem Material zu, der in einem Institut für biologische Mittelprüfung alltäglich ist.

Ähnliche Überlegungen, wie sie für den biologischen Test angestellt wurden, haben auch für die Bestimmung der Hemmung der Cholinesterase zu gelten. Es können eine Anzahl von Enzympräparaten unterschiedlicher Empfindlichkeit hergestellt werden. Durch Bestimmung der unterschiedlichen Hemmung, die durch denselben Rückstand in verschiedenen Präparaten erfolgt, kann er möglicherweise einer bestimmten Gruppe von Wirkstoffen zugeordnet werden. Eine größere Anzahl von Enzympräparaten als 2 bis 3 erscheint ebenso wenig sinnvoll wie die Verwendung mehrerer Testorganismen gleichzeitig.

⁺) H.Frehse, Biol.Inst. der Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, "Die Analyse von Pflanzenschutzmittelrückständen".

Die Bestimmung von Rückständen mit der Cholinesterase-Methode gewinnt in jüngster Zeit an Bedeutung und Umfang. Eine Überprüfung und weitere Bearbeitung der Befunde aus der Literatur müßte zu Verfahren führen, die in der Lebensmittelüberwachung Eingang finden könnten. Da standardisierte Präparate heute bereits bezogen werden können, entfällt für ein Untersuchungsamt, das nicht auf die Herstellung von Enzympräparaten eingerichtet ist, das Problem der Beschaffung geeigneter Enzymquellen. Wird zur Bestimmung der in-vitro-Hemmung das papierchromatographische Verfahren von C o o k herangezogen, das anstelle der üblichen Farbreagentien die Rückstände mit Cholinesterase/Acetylcholin/Bromthymolblau sichtbar macht, kann eine große Anzahl von organischen Phosphorverbindungen und Carbamaten gleichzeitig qualitativ und quantitativ erfaßt werden.

Für die chlorierten Kohlenwasserstoffe kommen andere analytische Verfahren in Betracht. Bei weiterer Bearbeitung des in der vorliegenden Arbeit angegebenen Verfahrens dürfte die Dünnschichtchromatographie für alle Verbindungen anwendbar gemacht werden können. Es müßte beispielsweise möglich sein, auf einem von zwei gleichzeitig angesetzten Chromatogrammen die Silbernitratreaktion durchzuführen und auf dem anderen die entsprechende Fläche bzw. Schicht zu entfernen und einer Mikroextraktion zu unterziehen. Dieser Extrakt, der nur noch Bruchteile der Pflanzeninhaltsstoffe enthält, müßte sowohl für eine Gesamtchlorbestimmung als auch für die Gaschromatographie genügend rein sein.

Eine Reihe von spezifischen Analysenverfahren sollte aber einem Untersuchungsamt geläufig sein. Diese Bemerkung gilt für eine Auswahl von Wirkstoffen, die in großem Umfang angewendet werden. Das sind DDT, Gamma-HCH, Aldrin (Dieldrin), Parathion, Phosdrin, Metasystox, Malathion und Sevin.

Literaturverzeichnis.

- 1) Abderhalden, E. Handbuck der biologischen Arbeits-
methoden Bd. IX, 136, Berlin 1938
- 2) Agazzi, E.J. Anal. Chemistry 25, 237 (1953)
Peters, E.D.
Brooks, F.R.
- 3) Afscharpur, F. J. Econ. Ent. 55, 317 (1962)
O'Brien, R.D.
- 4) Armon, R. Fermente, Hormone, Vitamine
Dirschel, W. II, 141 ff. Stuttgart 1960
- 5) Arden, V. J. Econ. Ent. 49, 313 (1955)
- 6) Augustinsson, K.-B. Methods of Biochemical Analysis,
Vol. V, 1, Interscience, New York,
1955
- 7) Averell, F.R. Anal. Chemistry 20, 752 (1948)
Norris, M.W.
- 8) Ball, W.L. s.a. "Zur Toxikologie der Insekti-
Kang, K. zide", Berlin 1959, 19
- 9) Bann, J.M. J. Agric. Food Chem. 4, 937 (1956)
de Cino, T.J.
- 10) Beckman, H.F. J. Agric. Food Chem. 6, 104 (1958)
- 11) Benjamini, E. J. Econ. Ent. 52, 20 (1959)
- 12) Berger, R.S. J. Econ. Ent. 51, 186 (1958)
- 13) Blinn, M.S. J. Econ. Ent. 52, 647 (1959)
- 14) Bowman, J.S. J. Econ. Ent. 52, 773 (1959)
Casida, J.E.
- 15) Boyd, J.F. Dissertation 1957, Ann Arbor,
Michigan, Univ. Microfilms Nr.25072
- 16) Brady, U.E. J. Econ. Ent. 54, 1232 (1961)
Arthur, W.A.
- 17) Bringmann, G. Gesundheitsingenieur 81, 243 (1960)
Kühn, R.

- 18) Bruce, R.B. J. Agric. Food Chem. 3, 1017 (1955)
Howard, J.W.
Elsee, J.R.
- 19) Burchfield, H.P. J. Econ. Ent. 48, 210 (1955)
- 20) Burke, J. J. Agric. Food Chem. 8, 399 (1960)
Johnson, L.
- 21) Burke, J. J. Ass. Off. Agr. Chem. 45, 102 (1962)
Johnson, L.
- 22) Burke, J. J. Ass. Off. Agr. Chem. 45, 348 (1962)
Johnson, L.
- 23) Bushland, R.C. J. Econ. Ent. 44, 421 (1950)
- 24) Carpenter, C.P. J. Agric. Food Chem. 9, 30 (1961)
- 25) Casida, J.E. J. Agric. Food Chem. 4, 236 (1956)
- 26) Casida, J.E. J. Agric. Food Chem. 4, 772 (1956)
- 27) Casida, J.E. J. Agric. Food Chem. 5, 186 (1957)
- 28) Chamberlain, W.F. J. Econ. Ent. 54, 733 (1961)
Gatterdam, P.E.
Hopkins, D.E.
- 29) Claborn, H.V. J. Agric. Food Chem. 4, 941 (1956)
- 30) Cook, J.W. J. Ass. Off. Agr. Chem. 37, 984 (1954)
- 31) Cook, J.W. J. Ass. Off. Agr. Chem. 37, 987 (1954)
- 32) Cook, J.W. J. Ass. Off. Agr. Chem. 37, 989 (1954)
- 33) Cook, J.W. J. Ass. Off. Agr. Chem. 38, 150 (1955)
- 34) Cook, J.W. J. Ass. Off. Agr. Chem. 38, 826 (1955)
- 35) Cook, J.W. J. Ass. Off. Agr. Chem. 40, 664 (1957)
Blake, J.R.
Williams, M.W.
- 36) Coulson, D.M. J. Agric. Food Chem. 7, 250 (1959)
Cavanagh, L.A.
Stuart, J.
- 37) Dahm, P.A. J. Econ. Ent. 54, 343 (1961)
Gurland, J.
Lee, J.
Berlin, J.
- 38) Davidov, B. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 107, 259 (1953)
Radomsky, J.L.

- 39) Demoll, J. J. Chromatography 1, 24 (1958)
- 40) Demoll, J. Chromatogr. Review 1, 1 (1959)
- 41) Dowly, D.E. J. Econ. Ent. 52, 1015 (1959)
- 42) Drummond, R.O. J. Econ. Ent. 54, 1161 (1961)
- 43) Dubois, K. Adv. in Pest Control Research
Vol. IV, 117 ff., Interscience,
New York 1961
- 44) Edwards, C.A. J. Econ. Ent. 50, 622 (1957)
- 45) Ehrenhard, H. Anz. für Schädlingssk. 27, 1 (1945)
- 46) Fahey, J.E. J. Econ. Ent. 45, 700 (1952)
Hamilton, D.W.
Rings, R.W.
- 47) Fahey, J.E. J. Econ. Ent. 55, 179 (1962)
Rodríguez, J.G.
Rusk, A.W.
- 48) Finney, L. Probit Analysis, Cambridge Press,
2.Aufl. 1952
- 49) Fisher
Yates Statistical Tables for Biological,
Agricultural and Medical Research,
Edinburgh
- 50) Fisk, F.W. J. Econ. Ent. 46, 1059 (1953)
- 51) Frawley, J.P. J. Ass. Off. Agr. Chem. 35, 741 (1952)
- 52) Freeman, L. Sewage and Industrial Waters
25, 1331 (1953)
- 53) Freeman, L. Sewage and Industrial Waters
25, 491 (1953)
- 54) Frohberger, E. Höfchenbriefe 2, 10 (1949)
- 55) Fukuto, T.R. Adv. in Pest Control Research
Vol. IV, 148, Interscience, New York
1961
- 56) Gage, J.C. Adv. in Pest Control Research
Vol. IV, 183-210, Interscience, New
York 1961
- 57) Gammon, N. J. Agric. Food Chem. 7, 826 (1959)
- 58) Gammon, N. J. Agric. Food Chem. 7, 829 (1959)
- 59) Gasser, R. Z. Naturforschung 8b, 225 (1953)

- 60) Gatterdam, W.F. J. Econ. Ent. 55, 326 (1962)
- 61) Getz, M.E. J. Ass. Off. Agr. Chem. 45, 393 (1962)
- 62) Giang, P.A.
Hall, S.A. Anal. Chemistry 23, 1830 (1951)
- 63) Giang, P.A.
Smith, F.F. J. Agric. Food Chem. 4, 621 (1956)
- 64) Goulding, L.C. J. Econ. Ent. 52, 341 (1959)
S.A. J. Agric. Food Chem. 6, 111 (1958)
- 65) Günthard, E. Mitt. Schweiz. ent. Gesellschaft 18, 648 (1945)
- 66) Gunther, F.A.
Blinn, R.C. Analysis of Insecticides and Acaricides, Interscience, New York 1955
- 67) Gunther, F.A.
Blinn, R.C. ibidem S. 3 - 9, S. 131 - 148
- 68) Gyrisco, G.G. J. Agric. Food Chem. 8, 409 (1960)
- 69) Hartzell, M.
Burchfield, H.P.
Storrs, W.A. J. Econ. Ent. 48, 210 (1954)
- 70) Hazleton, L.W. J. Agric. Food Chem. 3, 312 (1955)
- 71) Helmkamp, G.A. J. Agric. Food Chem. 2, 836 (1954)
- 72) Hestrin, S.J. Biochem. J. 180, 249 (1949)
- 73) Hofferbert, W. Höfchenbriefe, 5, 10 (1952)
- 74) Hopkins, Th.L. J. Econ. Ent. 55, 334 (1962)
- 75) Huesmann, H. Anz. f. Schädlingssk. 33, 155 (1960)
- 76) Ivey, M.C. J. Agric. Food Chem. 9, 374 (1961)
- 77) Jacobsen, L.C. Methods of Biochemical Analysis Vol. IV, 171, Interscience, New York, 1957
- 78) Jones, L.R.
Riddick, J.A. Anal. Chemistry 24, 569 (1952)
- 79) Jucker, O. Mitt. Geb. Lebensm.-Unters. u. Hyg. 49, 299 (1958)
- 80) Kämpfe, L. Pharmazie 8, 575 (1953)

- 81) Karsten, G. Lehrbuch der Pharmakognosie,
Weber, U. 8.Aufl. Stuttgart 1956
- 82) Kirchner, J.G. Anal. Chem. 23, 420 (1951)
Hall, N.F. Anal. Chem. 24, 1480 (1952)
Miller, R. Anal. Chem. 25, 1107 (1953)
 Anal. Chem. 26, 2002 (1954)
- 83) Klein, A.K. J. Ass. Off. Agr. Chem. 39, 242
 (1956)
- 84) Klein, A.K. J. Ass. Off. Agr. Chem. 43, 703
 (1960)
- 85) Klotzsche, C. Mitt. Geb. Lebensm.-Unters. u.Hyg.
 52, 340 (1960)
- 86) Kocher Mitt. Schweiz. ent. Gesellschaft
Roth 26, 47 (1953)
Treboux
- 87) Kolbenzen, M.J. J. Agric. Food Chem. 2, 307 (1954)
Barsley, J.A.
- 88) Krüger, H.R. J. Econ. Ent. 52, 1063 (1959)
- 89) Krüger, H.R. J. Econ. Ent. 53, 25 (1960)
O'Brien, R.D.
- 90) Krüger, H.R. J. Econ. Ent. 54, 239 (1961)
Casida, J.E.
- 91) Langenbach, R. Nachr. dtsh. Pflanzenschutzdienst
 3, 118 (1951)
- 92) Lichtenstein, E.P. J. Agric. Food Chem. 8, 452 (1960)
Schulz, K.R.
- 93) Ligget, L.M. Anal. Chemistry 26, 748 (1954)
- 94) Lilly, J.H. J. Econ. Ent. 49, 815 (1956)
- 95) Listz, D.J. J. Agric. Food Chem. 9, 468 (1961)
- 96) Lüdicke, M. Anz. für Schädlingesk. 22, 58 (1949)
- 97) Lüdicke, M. Z. f. Pflanzenkr. u. Pflanzenschutz
 56, 31 (1949)
- 98) March, R.B. J. Agric. Food Chem. 2, 92 (1954)
- 99) March, R.B. J. Agric. Food Chem. 2, 732 (1954)
Metcalf, R.L.
Fukuto, T.R.
- 100) Menzel, D.B. J. Econ. Ent. 54, 9 (1961)
Hoskins, W.M.

- 101) Metcalf, R.L. Adv. in Pest Control Research
Vol. III, 405, Interscience,
New York 1960
- 102) Metcalf, R.L. J. Econ. Ent. 43, 670 (1950)
- 103) Metcalf, R.L. J. Econ. Ent. 44, 883 (1951)
- 104) Metcalf, R.L. J. Econ. Ent. 47, 1045 (1953)
- 105) Metcalf, R.L. J. Econ. Ent. 48, 355 (1954)
- 106) Metcalf, R.L. J. Econ. Ent. 48, 364 (1954)
- 107) Metcalf, R.L. J. Econ. Ent. 49, 738 (1955)
- 108) Metcalf, R.L. J. Econ. Ent. 54, 231 (1961)
Georghian, G.P.
- 109) Michael, A.S. Science 123, 464 (1956)
Thompson, C.G.
Abramowitz, M.
- 110) Mitchell, J.W. Adv. in Pest Control Research
Vol. III, 406, Interscience,
New York 1960
- 111) Mitchell, L.C. J. Ass. Off. Agr. Chem. 39, 484
(1956)
- 112) Mitchell, L.C. J. Ass. Off. Agr. Chem. 39, 891
(1956)
- 113) Mitchell, L.C. J. Ass. Off. Agr. Chem. 39, 980
(1956)
- 114) Mitchell, L.C. J. Ass. Off. Agr. Chem. 43, 810
(1960)
- 115) Mosebach, E. Nachr. dtsh. Pflanzenschutzdienst
Steiner, P. 11, 150 (1959)
- 116) Mosebach, E. Nachr. dtsh. Pflanzenschutzdienst
Steiner, P. 13, 33 (1961)
- 117) Müller, R. Mitt. Geb. Lebensm.- Unters. u. Hyg.
Schoch, H. 48, 152 (1957)
Ernst, G.
- 118) Nolan, K. Agric. Chemicals 5, 53 (1951)
Wilcoxon, F.
- 119) Norton, L.B. Anal. Chem. 20, 753 (1948)
Schmalzriedt, B.
- 120) O'Brien, R.D. J. Agric. Food Chem. 3, 56 (1955)
- 121) O'Brien, R.D. J. Econ. Ent. 50, 159 (1957)

- 122) O'Brien, R.D. J. Econ. Ent. 54, 1161 (1961)
- 123) O'Colla, P. J. Sci Food Agr. 3, 130 (1952)
- 124) Pagan, J.C. J. Econ. Ent. 42, 942 (1949)
- 125) Pagan, J.C.
Hagemann, R.H. Science 112, 222 (1950)
- 126) Paulig, G. Dtsch.Lebensmittel-Rundschau
57, 42 (1961)
- 127) Paulus, W. Arzneimittelforschung 6, 766 (1957)
- 128) Perry, A. J. Econ. Ent. 44, 815 (1951)
Hoskins, W.M.
- 129) Peters, D.D. Anal. Chemistry 24, 710 (1952)
Agazzi, E.J.
- 130) Pfaff, W. Z.f.Pflanzenkr. u. Pflanzenschutz
62, 361 (1955)
- 131) Phillips, F.W. J. Agric. Food Chem. 2, 1226 (1954)
de Benedictis, M.E.
- 132) Plapp, F.W. J. Agric. Food Chem. 6, 562 (1958)
Casida, J.E.
- 133) Ripper, W. Adv. in Pest Control Research Vol.I,
305, Interscience, New York 1957
- 134) Robbins, W.E. J. Agric. Food Chem. 5, 513 (1957)
- 135) Robbins, W.E. J. Econ. Ent. 51, 326 (1958)
- 136) Roberts, R.H. J. Econ. Ent. 51, 861 (1958)
- 137) Rosenthal, N. J. Ass.Off.Agr.Chem. 43, 732 (1960)
- 138) San Antonio J.Ass.Off.Agr.Chem. 43, 721 (1960)
- 139) Schrader, G. Angew.Chemie, Monographien Nr.62
Die Entwicklung neuer Insektizide
auf der Grundlage organischer Fluor-
und Phosphorverbindungen.
- 140) Sellke, K. Nachr.dtsch. Pflanzenschutzdienst
4, 221 (1949)
- 141) Seume, F.W. Dissertation, Göttingen, Landw.Fa-
kultät, 1957
- 142) Seume, F.W. J. Agric.Food Chem. 8, 41 (1960)
O'Brien, R.D.
- 143) Stahl, E. Chemiker-Zeitg. 82, 323
- 144) Stahl, E. Pharmazie 11, 633 (1956)

- 145) Steiner, P. Zur Toxikologie der Insektizide I,
Gruch, W. Mitt. aus der BBA, Heft 95
- 146) Steiner, P. Zur Toxikologie der Insektizide II,
 Mitt. aus der Biologischen Bundesan-
 stalt für Land- und Forstwirtschaft,
 Berlin, Heft 102
- 147) Sternburg, J. J.Econ.Ent. 46, 505 (1953)
Vinson, E.
Kearns, C.J.
- 148) Sterra, P.R. J.Econ.Ent. 54, 822 (1961)
- 149) Strache, F. Dtsch. Lebensmittelrundschau
Indinger, J. 57, 197 (1961)
- 150) Sun, Y.P. J. Econ. Ent. 46, 327 (1952)
- 151) Sun, Y.P. J. Econ. Ent. 47, 180 (1953)
Pankaskie, G.E.
- 152) Sun, Y.P. Adv.in Pest Control Research Vol.I,
 449 ff., Interscience, New York 1957
- 153) Tarpley, A.W. J. Econ. Ent. 51, 780 (1957)
- 154) Terriere, L.C. J. Econ. Ent. 46, 751 (1953)
Ingalsbe, D.W.
- 155) Terriere, L.C. J. Agric. Food Chem. 7, 502 (1959)
- 156) Tsuyuki, H. J. Agric. Food Chem. 3, 922 (1955)
Casida, J.E.
- 157) Wasserburger, H.J. Pharmazie 7, 731 (1952)
- 158) Wasserburger, H.J. Pharmazie 9, 838 (1954)
- 159) Westlake, W.E. J. Econ.Ent. 46, 850 (1953)
Butler, L.I.
- 160) White, T.T. Anal.Chemistry 25, 1664 (1953)
Penter, C.J.
Brooks, F.R.
- 161) Whittaker, V. Biochem. J. 54, 660 (1953)
- 162) Williams, M.W. J.Agric.Food Chem. 6, 514 (1958)
- 163) Wollerman, E.H. J. Econ.Ent. 48, 759 (1955)
Putnam, F.
- 164) Zweig, G. J. Agric. Food Chem. 8, 190 (1960)
Archer, T.E.
- 165) Zweig, G. J. Agric. Food Chem. 6, 910 (1958)
- 166) Zweig, G. J. Agric. Food Chem. 7, 178 (1958)

A N H A N G

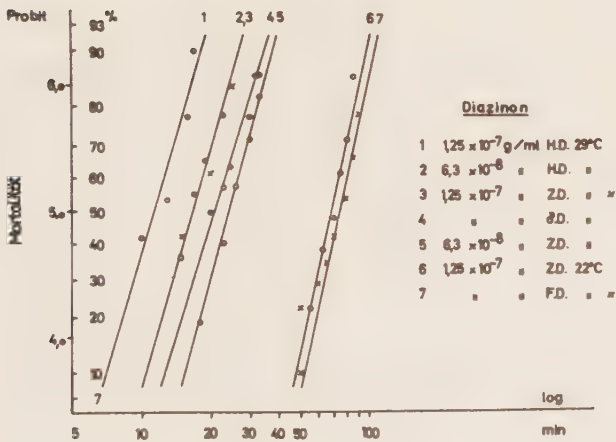
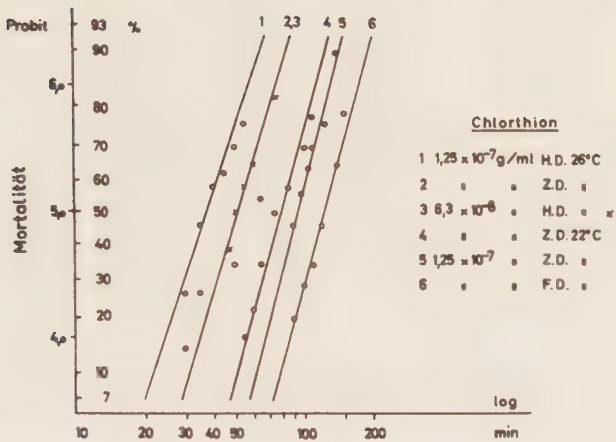


Abb. 13 u. 14

Unterschiedliche Wirkung bei verschiedenen Testbedingungen.

Text: s.S. 57/58

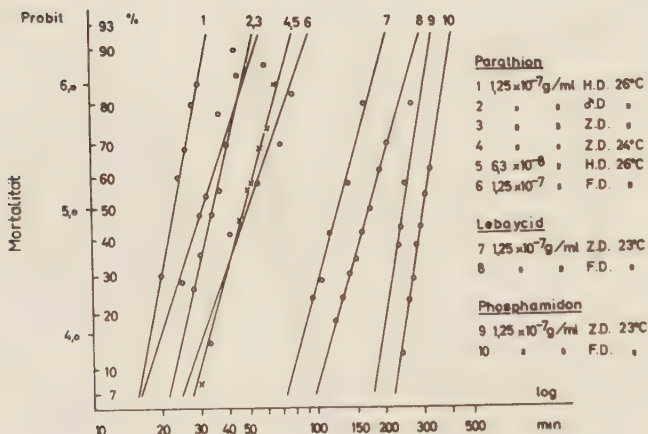
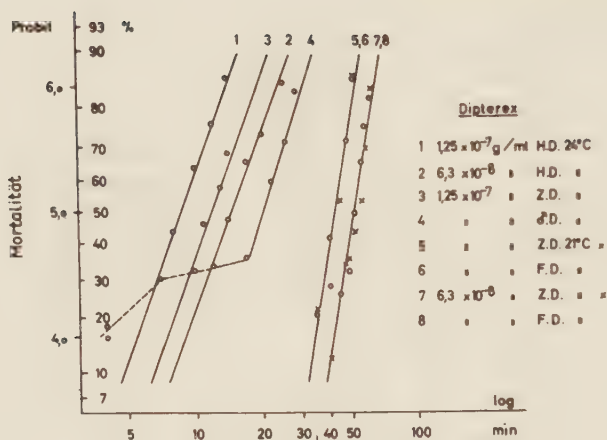


Abb. 15 u. 16

Unterschiedliche Wirkung bei verschiedenen Testbedingungen.

Text: u.S. 57/58

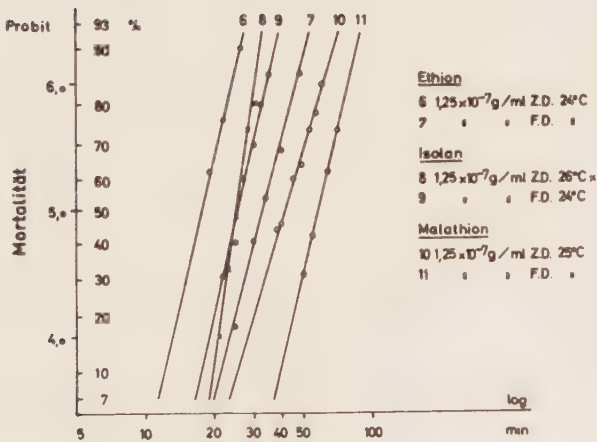
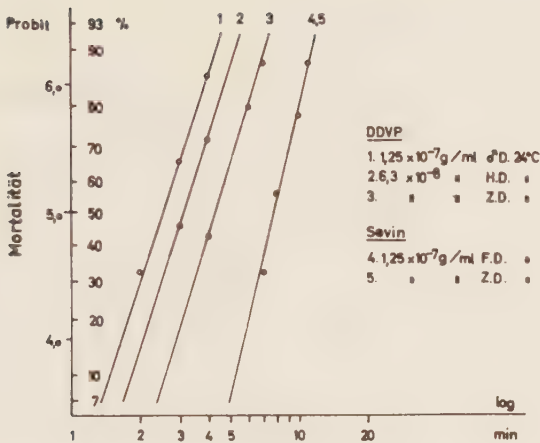


Abb. 17 u. 18

Unterschiedliche Wirkung bei verschiedenen Testbedingungen.

Text: s.S. 57/58

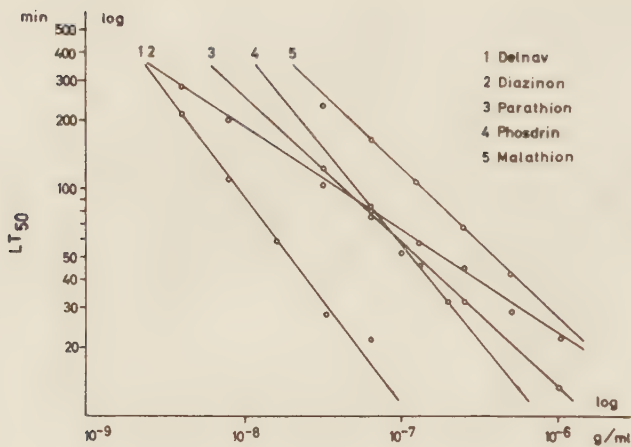


Abb. 19 Standardkurven bei 19 bis 22°C aufgenommen.

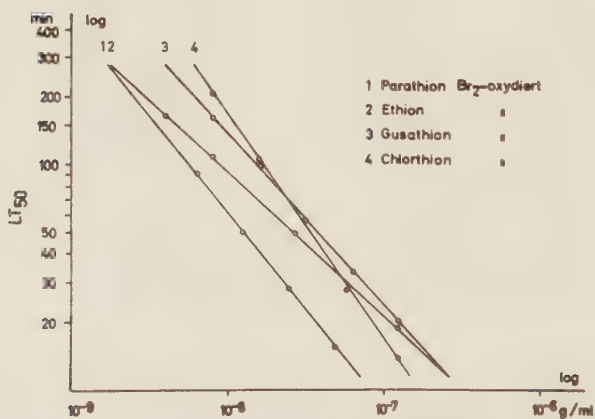


Abb. 20 Standardkurven bei 19°C bis 22°C aufgenommen.

F o r m e l n

A. Chlorierte Kohlenwasserstoffe.

A l d r i n

1,2,3,4,10,10-Hexachlor-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro 1,4,5,8,
bis (endo-exo)-methylen naphthalin

A l o d a n

5,6-Bis (chlormethyl)-1,2,3,4,7,7-hexachlorbicyclo- 2,2,1 -
hepten(2)

C h l o r b e n z i l a t

4,4'-Dichlorbenzilsäureäthylester

C h l o r d a n

2,3,4,5,6,7,8,8-Octachlor-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-
methyleninden

D i e l d r i n

1,2,3,4,10,10-Hexachlor-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octa-
hydro- 1,4,5,8,-bis-(endo-exo)-methylen-naphthalin

D D T

p,p'-Dichlor-1,1-diphenyl-2,2,2-trichloräthan

E n d r i n

1,2,3,4,10,10-Hexachlor-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octa-
hydro 1,4,5,8-bis (endo-exo)-methylen -naphthalin

G a m m a - H C H

Gamma-Hexachlorcyclohexan $(\frac{1,2,4,5}{3,6})$

H e p t a c h l o r

1,4,5,6,7,8,8-Heptachlor-4,7-endomethylen-3a,4,7,7a-tetra-
hydroinden

K c l t h a n

p,p'-Dichlor-1,1-diphenyl-2,2,2-trichloräthanol

Methoxychlor

p,p'-Dimethoxy-1,1-diphenyl-2,2,2-trichloräthan

Perthane

p,p'-Diäthyl-1,1-diphenyl-2,2,2-trichloräthan

Sarcobac

Gemisch aus chlorierten Terpenen, durchschnittlicher
Chlorgehalt 65 %

Thiodan

c,c',3,3',6,6'-Hexachlor-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-
methylen-2,4,7-benzodioxathiepin-3-oxyl

Toxaphen

Chloriertes Camphen, durchschnittlicher Chlorgehalt 68 %

B. Carbamate.

Dimetan

5,5-Dimethyldihydroresorcinyll-(1)-dimethyl-carbamat

Isolan

N-Dimethyl-, -isopropyl-, 3-methylpyrazolyl (5)-carbamat

Sevin

N-Methyl-naphthyl(1)-carbamat

C. Phosphorverbindungen.

Chlorthion

O,O-Diäthyl-O-(4-nitro-3-chlorphenyl)-thiophosphat

Delnav

O,O-Diäthyl-S,S-p-dioxanyl-(2,3)-bis-dithiophosphat

Demeton (Systox)

O,O-Diäthyl-O-2-(äthylthio)-äthyl -dithiophosphat

Diazinon

O,O-Diäthyl-O-(2-isopropyl-4-methyl-pyrimidyl-6)-thio-
phosphat

D D V P

O,O-Dimethyl-O-2,2-dichlorovinylphosphat

D i m e f o x

Tetramethyl-fluorylphosphorsäure-diamid

D i p t e r e x

O,O-Dimethyl-O-1-hydroxy-2,2,2-trichloroethylphosphonat

D i m e t h o a t

O,O-Dimethyldithiophosphoryl-N-methylacetamid

D i s y s t o n

O,O-Diaethyl-S- 2-(aethylthioethyl)- dithiophosphat

E P N

O-Aethyl-O-phenyl-O-p'-nitrophenyl-thiophosphat

E t h i o n

O,O,O',O'-Tetraaethyl-S,S'-methylen-bis-dithiophosphat

G u s a t h i o n

O,O-Dimethyl-S-(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-
dithiophosphat

M a l a t h i o n

O,O-Dimethyl-S- 1,2-bis-(aethoxycarbonylaethyl)-
dithiophosphat

M e r c a p t o p h o s (Lebaycid)

O,O-Dimethyl-O-(4-methylthio,3-methyl)-phenylthiophosphat

M e t a s y s t o x

O,O-Dimethyl-O- 2-(aethylthio)-aethyl -thiophosphat

P a r a t h i o n (E 605)

O,O-Diaethyl-O-p-nitrophenyl-thiophosphat

P h o s d r i n (PD 5)

O,O-Dimethyl-O- (1-methyl-2-methoxycarbonyl)-vinyl -
phosphat

Phosphamidon

O,O-Dimethyl-O-(1-methyl-2-chlor-2-diaethcarbamoyl)-vinyl-phosphat

Ronnel

O,O-Dimethyl-O-(2,4,5-trichlorphenyl)-thiophosphat

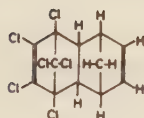
Schradan (OMPA)

Octamethylpyrophosphorsäuretetramid

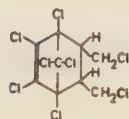
Trithion

O,O-Diaethyl-S-(p-chlorphenylthio)-methyl-dithiophosphat

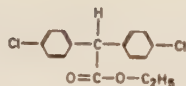
Aldrin



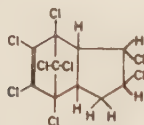
Alodan



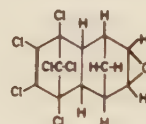
Chlorbenzilat



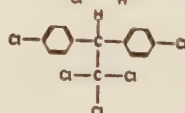
Chlordan



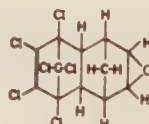
Dieldrin



DDT



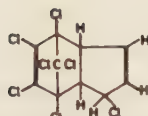
Endrin



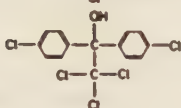
γ-HCH



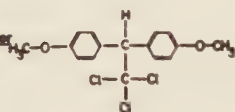
Heptachlor



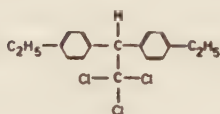
Kelthane



Methanachlor



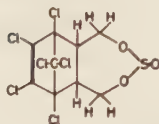
Perthane



Strabon

chloriertes Terpen, 65% Cl₂

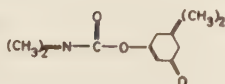
Thieden



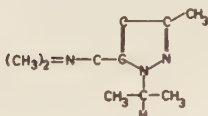
Toxaphen

chloriertes Camphen, 67-69% Cl₂

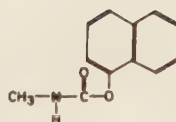
Dimeton



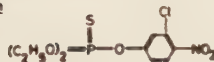
Japlan



Sevin



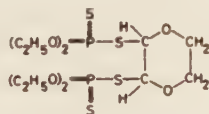
Chlorthion



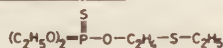
DDVP



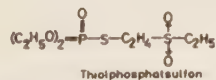
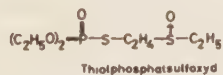
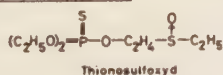
Delnav



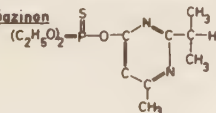
Demeton (+Systox)

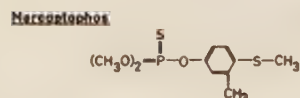
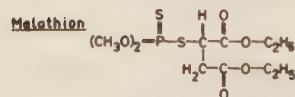
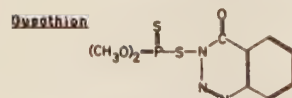
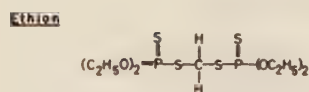
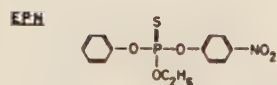
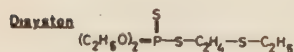
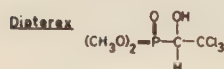
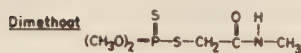
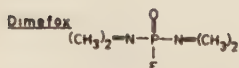


Demetonmetabolite

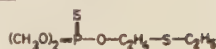


Diazinon





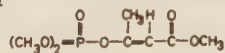
Malathion



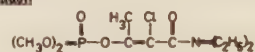
Parathion



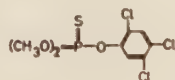
Phosdrin



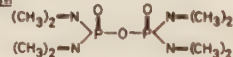
Phosphamidon



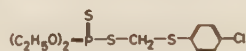
Renal



Schradon



Irithion



Lebenslauf

Am 21. September 1933 wurde ich, Klaus Heinrich Knopf, als viertes Kind des jetzt im Ruhestand lebenden Straßenbauinspektors Heinrich Knopf und seiner Ehefrau Sophie, geb. Boßhardt, in Pforzheim geboren.

Bis zum Beginn meines Studiums lebte ich bei meinen Eltern in Pforzheim und besuchte dort von Ostern 1940 bis Herbst 1944 die Volksschule und anschließend bis zum Abitur im Frühjahr 1953 das humanistische Reuchlin-Gymnasium. Im April 1953 trat ich als Apothekerpraktikant in die Nordstadt-Apotheke zu Pforzheim ein, die ich nach der pharmazeutischen Vorprüfung im Frühjahr 1955 verließ, um ab Sommersemester desselben Jahres an der Albert-Ludwig-Universität zu Freiburg i.Br. Pharmazie zu studieren. Das Studium konnte ich am 26. März 1958 mit der pharmazeutischen Staatsprüfung beenden. Zur Erlangung der Approbation als Apotheker arbeitete ich ab Mai 1958 ein Jahr als Kandidat der Pharmazie in der Alten Apotheke zu Stuttgart-Untertürkheim.

Im Mai 1959 begann ich meine Tätigkeit als Praktikant im Untersuchungsamt der Stadt Frankfurt am Main und immatrikulierte mich zugleich an der Johann Wolfgang Goethe-Universität für das Fach Lebensmittelchemie. Im Mai 1960 legte ich in Frankfurt am Main die Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker ab. Herr Prof. Dr. Dr. D i e m a i r übertrug mir danach eine Dissertationsarbeit über den Nachweis von Rückständen von Insektiziden auf Obst und Gemüse. Mit der praktischen Durchführung der Arbeit begann ich Ende des Sommersemesters 1960 und schloß sie im August 1962 ab.

